

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Alan Ivković

**Cijeljenje oštećenja zglobne hrskavice nakon
liječenja genski promijenjenim ugruškom
autologne koštane moždine**

DISERTACIJA



Zagreb, 2009.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Alan Ivković

**Cijeljenje oštećenja zglobne hrskavice nakon
liječenja genski promijenjenim ugruškom
autologne koštane moždine**

DISERTACIJA

Zagreb, 2009.

Disertacija je izrađena na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Zavodu za histologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: akademik **Marko Pećina**

Zahvaljujem:

svom učitelju i mentoru akademiku **Marku Pećini** na brizi, razumijevanju i strpljenju, te na neiscrpoj znanstvenoj i stručnoj pomoći koju mi je pružio, ne samo tijekom izrade ove disertacije, već i tijekom čitave moje ortopedske karijere,

prof.dr.sc. **Miroslavu Hašplu** na velikoj pomoći u svladavanju kirurških tehnika u ortopediji, kao i na poticaju za uključivanje u bazična i klinička istraživanja na području liječenja ozljeda i bolesti hrskavice,

Damiru Hudetzu na velikoj pomoći tijekom dizajniranja i provedbe cjelokupnog istraživanja,

prof.dr.sc. **Draženu Matičiću** i cijelom timu Klinike za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na pomoći u provedbi eksperimentalnog dijela istraživanja,

prof.dr.sc. **Davoru Ježeku, Andreji Vukasović i Ivanu Cerovečkom** na pomoći u analizi histoloških preparata,

Ratku Rudiću i Goranu Gazivodi na nesebičnoj i pravovremenoj podršci,

mojim dragim roditeljima,

a rad u cijelosti posvećujem **Jani i Jakovu** koji ionaku svemu daju smisao.

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	<i>Prikaz problema.....</i>	<i>1</i>
1.2.	<i>Građa i funkcija hrskavice.....</i>	<i>2</i>
1.3.	<i>Odgovor zglobne hrskavice na ozljedu.....</i>	<i>6</i>
1.3.1.	<i>Reparacija i regeneracija.....</i>	<i>6</i>
1.3.2.	<i>Čimbenici koji utječu na biološki odgovor hrskavice na ozljedu.....</i>	<i>7</i>
1.4.	<i>Principi liječenja oštećenja zglobne hrskavice.....</i>	<i>9</i>
1.4.1.	<i>Palijativni princip liječenja oštećenja zglobne hrskavice.....</i>	<i>10</i>
1.4.2.	<i>Reparativni princip liječenja oštećenja zglobne hrskavice.....</i>	<i>11</i>
1.4.3.	<i>Regenerativni princip liječenja oštećenja zglobne hrskavice.....</i>	<i>14</i>
1.5.	<i>Mezenhimalne stromalne stanice.....</i>	<i>17</i>
1.6.	<i>Regulacija hondrogeneze bioaktivnim molekulama.....</i>	<i>20</i>
1.6.1.	<i>Čimbenici rasta.....</i>	<i>21</i>
1.6.2.	<i>Transkripcijski čimbenici.....</i>	<i>22</i>
1.6.3.	<i>Antikatabolički čimbenici.....</i>	<i>22</i>
1.7.	<i>Principi primjene genske terapije.....</i>	<i>23</i>
1.7.1.	<i>Vektori.....</i>	<i>25</i>
1.7.2.	<i>Ciljne stanice.....</i>	<i>28</i>
1.7.3.	<i>Promotor.....</i>	<i>29</i>
1.7.4.	<i>Strategija prijenosa gena u liječenju ozljeda hrskavice.....</i>	<i>29</i>
2.	HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	36
3.	MATERIJALI I METODE.....	37
3.1.	<i>Eksperimentalne životinje i kirurški zahvat.....</i>	<i>37</i>
3.2.	<i>Primijenjeno sredstvo i način primjene.....</i>	<i>39</i>
3.2.1.	<i>Priprema adenoviralnog vektora s uputom za kodiranje TGF-β1 i GFP (Ad. TGF-β1 i Ad.GFP)</i>	<i>39</i>
3.2.2.	<i>Priprema genski promijenjenog ugruška autologne koštane moždine.....</i>	<i>40</i>
3.2.3.	<i>Istraživački postupnik i priprema preparata za analize.....</i>	<i>41</i>
3.4.	<i>Mikroskopska analiza hrskavice.....</i>	<i>45</i>
3.5.	<i>Biokemijska analiza hrskavice.....</i>	<i>46</i>
3.6.	<i>Biomehanička analiza hrskavice.....</i>	<i>48</i>

3.7.	<i>Analiza sinovijalne ovojnice metodom PCR</i>	49
3.8.	<i>Statistička analiza</i>	50
4.	REZULTATI	52
4.1.	<i>Mikroskopska analiza cijeljenja hrskavice</i>	52
4.2.	<i>Biokemijski parametri cijeljenja hrskavice</i>	62
4.3.	<i>Dinamički modul elastičnosti</i>	66
4.3.1.	<i>Čvrstoća hrskavice na mikrometarskom nivou organizacije tkiva</i>	66
4.3.2.	<i>Čvrstoća hrskavice na nanometarskom nivou organizacije tkiva</i>	68
4.4.	<i>Prisutnost adenovirusa u stanicama sinovije</i>	72
5.	RASPRAVA	74
6.	ZAKLJUČAK	91
7.	SAŽETAK	93
8.	SUMMARY	95
9.	LITERATURA	97
10.	ŽIVOTOPIS	110

KORIŠTENE KRATICE

Ad – adenoviralni vektor

MSS – mezenhimalne stromalne stanice

TGF- β 1 – transformirajući čimbenik rasta-beta 1 (engl. transforming growth factor- β 1)

GFP – zeleni fluorescentni protein (enlg. green fluorescent protein)

GAG – glikozaminoglikani

IGF-1 – inzulinu-sličan čimbenik rasta-1 (engl. insulin-like growth factor-1)

IM – izvanstanični matriks

PCR – reakcija lančane polimeraze (engl. polymerase chain reaction)

IT AFM – mikroskop atomskih sila indentacijskog tipa (enlg. indentation-type atomic force microscopy)

HE – hemalaun-eozin

HLA – humani leukocitni antigen (engl. human leukocyte antigen)

CD – površinski biljeg (engl. cluster of differentiation)

1. UVOD

1.1. Prikaz problema

Zglobna je hrskavica osobit oblik vezivnog tkiva, iznimno čvrstog izvanstaničnog matriksa (IM) koji joj omogućava podnošenje velikih mehaničkih opterećenja, i to poglavito zbog guste mreže kolagenskih vlakana koja sprječavaju preveliko gibanje vode. Hijalina hrskavica u odraslih nema krvnu opskrbu, limfnu drenažu i inervaciju, a hranjive tvari dobiva difuzijom iz sinovijalne tekućine ili okolnih tkiva. Upravo zbog ovih razloga regenerativni potencijal hrskavice je vrlo ograničen. Samo u slučaju minimalnog oštećenja matriksa, hondrociti su sposobni sintetizirati nove proteoglikane i u potpunosti obnoviti oštećenu hrskavicu.^{1,2} U slučaju većih oštećenja proces reparacije započinje u suphondralnoj koštanoj moždini koja je izvor progenitornih stanica koje dolaze u područje oštećenja. Na žalost, takvo novostvoreno tkivo obično ima puno fibroznih elemenata, relativno brzo degenerira i ne može adekvatno zamjeniti normalnu hijalinu hrskavicu.³

Ozljede i oštećenja zglobne hrskavice vrlo su česti u ortopediji i sportskoj medicini. Rezultati retrospektivne analize preko 30 000 artroskopija pokazali su da je incidencija hrskavičnih ozljeda 63%.⁴ Slične rezultate pokazala je i analiza 993 artroskopije koljena, kojom je utvrđena incidencija hrskavičnih ozljeda od 66%.⁵ Obje ove studije obuhvatile su veliki uzorak ispitanika, i zorno ukazuju na zastupljenost ovog problema u općoj ortopedskoj problematici. Važno je naglasiti kako ova oštećenja najčešće nastaju u trećem i četvrtom desetljeću života, odnosno pogađaju populaciju koja se nalazi u radno najproduktivnijem razdoblju života, i svako takvo oštećenje predstavlja rizik za rani razvoj osteoartritisa, uz značajno smanjenje kvalitete života i povećanje troškova zdravstvene zaštite.^{6,7} Iako se trenutačno korištenim metodama liječenja oštećenja hrskavice postižu

relativno dobri klinički rezultati, niti jedna metoda nije do sada uspjela u potpunosti regenerirati normalnu hijalinu hrskavice i supondralnu kost. Upravo zbog toga, istraživanja novih mogućnosti liječenja oštećenja zglobne hrskavice predstavljaju izazov podjednako i za kliničare i za one koji se bave bazičnom znanosti.^{5,6}

1.2. Građa i funkcija hrskavice

Ovisno o sastavu izvanstaničnog matriksa, hrskavično tkivo u čovjeka možemo razvrstati u elastičnu, fibroartilaginoznu, fibroelastičnu i hijalinu hrskavicu. Hijalina hrskavica je specijalizirano tkivo koje prekriva klizne plohe sinovijalnih zglobova, i u pravilu se naziva zglobnom hrskavicom. Razvija se iz mezenhimalne osnove, i to u 5. gestacijskom tjednu kada se nekoliko mezenhimalnih stanica stapa u blastemu. Blastema potom počinje stvarati izvanstanični matriks, a same stanice blasteme tada nazivamo hondroblastima. Vremenom matriks postaje sve obilniji, razmiče stanice jedne od druge, te one postaju hondrociti. Iz mezenhimalnog tkiva u okolini blasteme razvija se membrana koju nazivamo perihondrij.

Kao što je već spomenuto, hrskavično tkivo nema krvnu, žilnu i limfnu opskrbu, a udio hondrocita u ukupnom volumenu hrskavice iznosi svega 1-5%.⁸ Hondrociti su stanice sferoidnog oblika, a poput osteocita, pojedine stanice nisu u međusobnom kontaktu, već su smještene u šuplinama koje nazivamo lakunama. Osnovna je uloga hondrocita sinteza i održavanje izvanstaničnog matriksa. Obzirom na to, svaka pojedinačna stanica ima vrlo intenzivnu metaboličku aktivnost, no kako je udio stanica u ukupnom volumenu tkiva nizak, tako je i ukupna metabolička aktivnost hrskavice kao tkiva niska.⁹ Koncentracija kisika unutar hrskavice također je vrlo niska, što znači da hondrociti ovise o anaerobnom metabolizmu. Izmjena tvari odvija se difuzijom preko izvanstaničnog matriksa, a pH

vrijednost iznosi 7.4. Svako odstupanje od idealne pH vrijednosti može vrlo brzo narušiti visoko specijaliziranu infrastrukturu izvanstaničnog matriksa, te dovesti do propadanja hrskavice.¹⁰ Molekule vode, kolagena i proteoglikana čine osnovne strukturne jedinice izvanstaničnog matriksa, a za njihovu sintezu su zaduženi hondrociti.

Voda. Voda čini najveći dio hrskavice, i njena težina čini čak 65-80% ukupne težine tkiva. Voda omogućava plastičnu deformaciju hrskavice prilikom mehaničkog opterećenja, te je izvor medija za smanjivanje trenja prilikom gibanja zglobnih ploha. Značaj vode ilustrira i činjenica kako je kod osteoartritisa, a uslijed povećane permeabilnosti zbog disrupcije matriksa, količina vode u tkivu smanjena čak za 90%.

Kolagen. Čini 10-20% ukupne težine hrskavice i razlikujemo nekoliko osnovnih podvrsta (vidi Tablicu 1.). Kolagen tipa II glavna je komponenta izvanstaničnog matriksa i njegov udio u kolagenskom sastavu zdrave hrskavice iznosi 90-95%. Kolagenska vlakna tvore čvrstu trodimenzionalnu mrežu koja hrskavici daje otpornost na sile vlaka, tlaka i smika.

Proteoglikani. Proteoglikani su osobita vrsta glikoproteina koji se sastoje od proteinske jezgre (engl. core protein) i jednog ili više kovalentno vezanih glikozaminoglikanskih lanaca (GAG). Glikozaminoglikani su po svojoj strukturi disaharidi, a njihovi su lanci stabilizirani centralno smještenom hijaluronskom kiselinom. Dvije su vrste ovih molekula prisutne u hrskavici: hondroitin sulfat i keratin sulfat. Obzirom na veličinu proteoglikane možemo podijeliti u dvije velike skupine: veliki proteoglikanski monomeri ili agrekani, te mali proteoglikani kao što su dekorin, biglikan i fibromodulin. Osnovna funkcija proteoglikana je održavanje ravnoteže vode i elektrolita. Negativno nabijene sulfatne i karboksilne skupine privlače samo pozitivno nabijene molekule. To rezultira povećanom koncentracijom iona natrija, odnosno povećanom osmolalnošću hrskavice, te u konačnici i

stvaranjem Gibbs-Donnanove ravnoteže.¹¹ Radi se o fenomenu koji je ključ razumijevanja iznimnih biomehaničkih osobina hrskavice, a stvara se kada se suprotno nabijene čestice nađu u blizini polupropusnih membrana. Obzirom da je unutar hrskavičnog tkiva prisutna velika količina fiksiranog negativnog naboja koji ne može prolaziti kroz membranu, ioni natrija ulaze u tkivo te povećavaju osmotski tlak koji djeluje tako da širi tkivo. Kolagena vlakna uravnotežuju djelovanje tog tlaka, te na taj način stvaraju stabilan sustav koji je iznimno otporan na djelovanje kompresivnih sila koje djeluju na zglobovu hrskavicu prilikom gibanja zglobova.

Tip kolagena	Morfološki smještaj	Funkcija
II	Osnovna komponenta velikih vlakana (90-95%)	Opire se silama vlaka
VI	Pericelularni matriks	Pomaže hondrocitima da se vežu za matriks
IX	Ukriženo povezan s površinom velikih vlakana	Opiranje silama vlaka te omogućavanje interfibrilarnih spojeva
X	Usko povezan s hipertrofiranim hondrocitima u kalcificiranom sloju	Strukturna potpora i pomoć u mineralizaciji kalcificiranog sloja
XI	Unutar velikih vlakana	Omogućava stvaranje velikih vlakana

Tablica 1. Različiti tipovi kolagena i njihova funkcija.

Hondrociti organiziraju kolagen, proteoglikane i nekolagenske proteine u jedinstveno, visokospecijalizirano tkivo otporno na velika mehanička naprezanja. Sastav, struktura i funkcija hondrocita se razlikuje obzirom na dubinu smještaja stanica u odnosu

na površinu hrskavice. Morfološki razlikujemo četiri sloja, počevši od površine prema suphondralnoj kosti: površni, prijelazni, duboki i kalcificirani sloj (vidi sliku 1.).

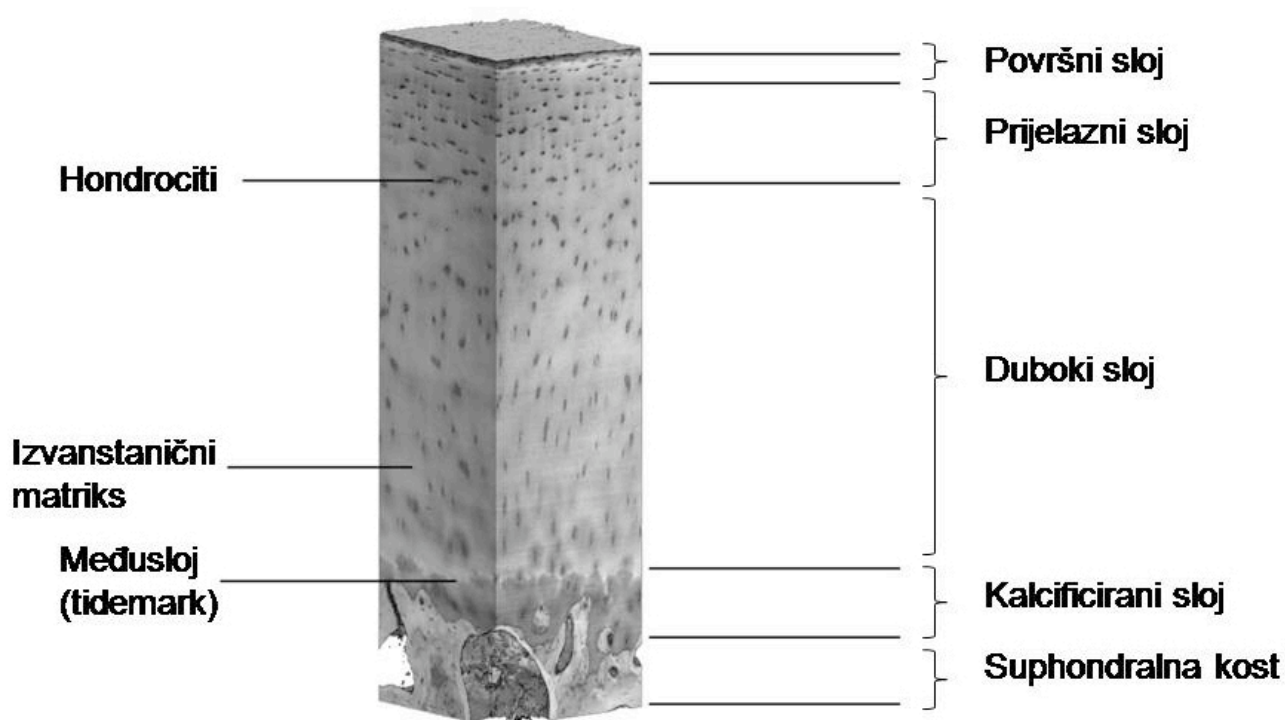
Površni sloj. Najtanji od svih slojeva, i čine ga spljošteni, elipsoidni hondrociti koji su postavljeni paralelno u odnosu na površinu. Prekriven je tankim slojem sinovijalne tekućine koji se naziva lubricin ili lamina splendens, i odgovoran je za vrlo nizak koeficijent trenja površine zglobne hrskavice. Hondrociti u ovoj zoni sintetiziraju visoke koncentracije kolagena i niske koncentracije proteoglikana, što rezultira visokim udjelom vode. Paralelno postavljena kolagenska vlakna daju ovome sloju veliku otpornost na sile smika.

Prijelazni sloj. Gustoća stanica je u manja u ovom sloju, a predominiraju stanice sferoidnog oblika uklopljene u obilni matriks. Kolagena vlakna velikog promjera su nasumično raspoređena, a koncentracija je proteoglikana veća negoli u površnom sloju.

Duboki sloj. Stanice su ovom sloju sferoidnog oblika i okomito su usmjerene u odnosu na površinu. Kolagena vlakna imaju najveći promjer, a također je i koncentracija proteoglikana najveća.

Kalcificirani sloj. Nalazi se između suphondralne kosti i nemineralizirane hrskavice, te sadrži mali broj stanica uklopljenih u mineralizirani matriks. Hondrociti pokazuju hipertrofičan fenotip i jedinstveni su po tome što sintetiziraju kolagen tipa X, koji tom sloju daje veliku čvrstoću i sposobnost apsorpcije i preraspodjele velikih mehanički opterećenja duž suphondralne kosti. Vidljiva granica između dubokog i kalcificiranog sloja naziva se međusloj (op.a. u engleskom jeziku za ovaj dio hrskavice ustalio se slikoviti termin *tidemark*, koji označava razinu plime na obali). Međusloj ima osobiti afinitet za bazične boje (primjerice toluidin), a važan je u prijelazu prema manje otpornoj suphondralnoj kosti. Dugo se vjerovalo da je ovaj sloj inaktivan, dok Hunziker i suradnici

nisu dokazali kako hondrociti u ovoj zoni mogu inkorporirati obilježeni atom sumpora (^{35}S) u matriks.¹²



Slika 1. Shematski prikaz ultrastrukturne građe hijaline hrskavice.

1.3. Odgovor zglobne hrskavice na ozljedu

1.3.1 Reparacija i regeneracija

Prije svega potrebno je razlučiti dva termina koja se često upotrebljavaju za opisivanje cijeljenja hrskavice, i razlikuju se obzirom na konačan rezultat: **reparacija** i **regeneracija**. Reparacija je proces u kojem dolazi do obnove hrskavice tkivom koje se sastoji od vezivnih i hrskavičnih elemenata i nazivamo ga fibrokartilaginoznim reparatom.

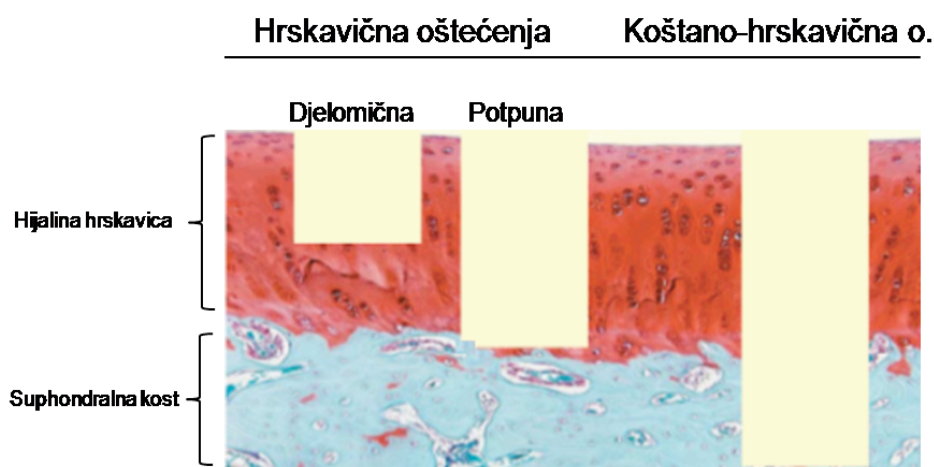
Ovakvo tkivo nalikuje nativnoj hrskavici, ali se od njega razlikuje građom, strukturom i funkcijom. U pravilu prevladava kolagen tipa I, a biomehaničke osobine ovakvog reparata su lošije od nativne hrskavice. Sve metode liječenja koje su danas u kliničkoj upotrebi rezultiraju upravo stvaranjem fibrokartilaginoznog reparata. Regeneracija se odnosi na stvaranje tkiva koje je identično nativnoj hrskavici, kako građom i strukturom, tako i svojom funkcijom.

Odgovor organizma na ozljedu pravilan je slijed precizno reguliranih mehanizama koji za cilj imaju što brže i učinkovitije sanirati posljedice ozljede. Faze ovoga slijeda su redom: nekroza, upala, reparacija i remodeliranje ožiljka, a pojedinosti ovog procesa variraju u odnosu na tkivo u kojem se zbivaju. Obzirom kako je hrskavica avaskularna struktura, nije u stanju proizvesti najvažniji dio ovog procesa – upalu. Samim tim, intrinzička sposobnost cijeljenja hrskavice je vrlo mala. Optimalno liječenje hrskavičnih oštećenja za cilj ima stvaranje tkiva koje se svojom građom i funkcijom neće razlikovati od nativne hrskavice.

1.3.2. Čimbenici koji utječu na biološki odgovor hrskavice na ozljedu

Dubina oštećenja. Obzirom na dubinu, hrskavična oštećenja možemo podijeliti na hrskavična ili hondralna i koštano-hrskavična ili osteohondralna (slika 2). Čisto hondralno oštećenje dalje možemo podijeliti na potpuno oštećenje (engl. full-thickness) koje seže do suphondralne kosti (bez zadiranja u kost), i djelomično oštećenje (engl. partial-thickness) koje zahvaća samo dio hrskavice. Hrkavična oštećenja u pravilu ne cijele, i s vremenom se povećavaju. Koštano-hrskavična oštećenja prelaze međusloj, zadiru u suphondralnu kost i omogućavaju ulazak mezenhimalnih progenitornih stanica u oštećenje, i samim tim i stvaranje fibrokartilaginoznog reparata.

Veličina oštećenja. Promjer oštećenja je podjednako važan čimbenik koji utječe na odgovor ozlijeđene hrskavice. Istraživanja su pokazala kako oštećenja promjera manjeg od 3 mm mogu u potpunosti zacijeliti unutar 9 mjeseci, dok oštećenja većeg promjera gotovo nikada ne cijele.¹³ U pravilu opseg oštećenja izražavamo u jedinicama površine, i obično govorimo kako oštećenja manja od 1 cm² ne dovode do poremećaja raspodjele mehaničkih naprezanja, te je vjerojatnost daljnjeg širenje relativno mala.



Slika 2. Klasifikacija hrskavičnih oštećenja prema dubini (safranin O - fast green bojanje, povećanje 10x).

Dob. Vrlo važan čimbenik rizika, osobito za razvoj prijevremenih artrotskih promjena. Poznato je kako starenjem dolazi do smanjenja sadržaja vode u hrskavici, a također se smanjuju i sintetske i mitotičke sposobnosti hondrocita. Animalne studije su tako pokazale bolje reparativne sposobnosti kod mlađih životinja.¹⁴

Trauma. U pravilu mehanička trauma zgloba nastaje kao jednokratno djelovanje velike sile koja oštećuje hrskavicu i/ili suphondralnu kost, ili kao ponavljano mikrooštećenje u sklopu sindroma prenaprezanja. Klasičan primjer ovog potonjeg je i osteohondritis

disekans koji se najčešće javlja kod mlađih sportaša u području koljena, lakta i gležnja, a radi se o segmentalnoj nekrozi suphondralne kosti s pripadajućom hrskavicom.¹⁵

Loše usmjerenje zglobova (engl. *mechanical malalignment*). Abnormalno opterećenje zglobova uslijed lošeg usmjerenja dovodi do pretjeranog žarišnog opterećenja zglobne hrskavice, što dovodi do prijevremenih degenerativnih promjena.¹⁶ Smještaj oštećenja u odnosu na opterećenje može biti vrlo važan čimbenik u kontekstu cijeljenja oštećenja. Upravo se na toj činjenici temelje korektivne osteotomije kojima ispravljamo loše usmjerenje, omogućavamo bolje cijeljenje i sprječavamo razvoj prijevremenih degenerativnih promjena.

Imobilizacija. Imobilizacija i smanjeno opterećenje zgloba dovode do smanjenja sinteze proteoglikana, a proces je do određene mjere reverzibilan. Ukoliko predugo traje dolazi do disrupcije kolagenskih vlakana i proces postaje ireverzibilan.

1.4. Principi liječenja oštećenja zglobne hrskavice

Još je 1743. škotski anatom i liječnik William Hunter napisao kako je “ulcerirana hrskavica veliki problem, i jednom oštećena, više se ne obnavlja”.¹⁷ Ova njegova tvrdnja, stara skoro tri stoljeća podjednako je aktualna i danas. Regeneracija hrskavice spada među najveće izazove moderne ortopedije, i veliki broj znanstvenika, kliničara i inženjera uključen je u bazična i primjenjena istraživanja, koja za cilj imaju pronaći optimalnu metodu liječenja oštećene hrskavice.

Iako se na prvi pogled čini kako su hrskavična oštećenja relativno minorne ozljede i privremeno stanje, u stvarnosti, ovakve ozljede ukoliko se ne liječe dovode do razvoja prijevremenih degenerativnih promjena zgloba – osteoartritisa. Kao što je već rečeno, kod

manjih oštećenja nastaje samo gubitak kolagenskog matriksa, dok kod većih oštećenja nastupa propadanje hondrocita i trajno oštećenje zglobne hrskavice. Moderna ortopedija ne poznaje optimalnu metodu koja bi u cijelosti regenerirala oštećenu hrskavicu. Za sada nije poznata farmakološka terapija koja bi regenerirala hrskavicu, te je stoga liječenje u pravilu operacijsko. Izbor metode ovisi stadiju bolesti, bolesnikovu zanimanju i dobi, općem stanju organizma i sl. Cilj je operacijskog liječenja smanjiti bol i poboljšati funkciju zgloba. Obzirom na biološku pozadinu operacijske zahvate možemo podijeliti na palijativne, reparacijske i regeneracijske. Sve nabrojane metode možemo svrstati u zajedničku skupinu tzv. kauzalnih zahvata, odnosno zahvata kojima se pokušava rješavati osnovni uzrok problema – oštećenje.¹⁸ Ostali zahvati u pravilu rješavaju posljedice oštećenja, odnosno osteoartritis, a tada se najčešće koristimo korektivnim osteotomijama, artroplastikama i artrodezama.

1.4.1. Palijativni princip liječenja oštećenja zglobne hrskavice

Palijativni zahvati, kako im i samo ime sugerira samo privremeno uklanjaju bol i u principu nisu trajno rješenje. Najčešće upotrebljavana palijativna tehnika je toaleta ili debridman zgloba koju je prvi puta opisao Magnuson¹⁹ još 1941. godine, a koja uključuje obilno ispiranje zgloba vodom, te uklanjanje svih nestabilnih i slobodnih fragmenata hrskavice, uklanjanje osteofita, kao i meniscektomiju ukoliko je potrebno. Danas se ovaj zahvat izvodi isključivo artroskopski, a na taj se način uklanja debris, proupalni citokini i proteaze koji doprinose daljnjem propadanju hrskavice. Iako ovakvo liječenje može privremeno dovesti do smanjenja tegoba, ono nije kauzalno i neće zaustaviti progresiju degenerativnih promjena zgloba. Postoje različita mišljenja o tome da li artroskopska lavaža ima svoje mjesto u liječenju osteoartritisa, no u slučaju lokaliziranih hrskavičnih

oštećenja, sasvim je jasno da ovakvo liječenje bez dodatnih zahvata nema nikakav učinak.^{20,21} U pravilu se danas artroskopska toaleta ne izvodi kao samostalan zahvat, već kao priprema za neku od tehnika stimulacije koštane moždine.

1.4.2. Reparacijski princip liječenja oštećenja zglobne hrskavice

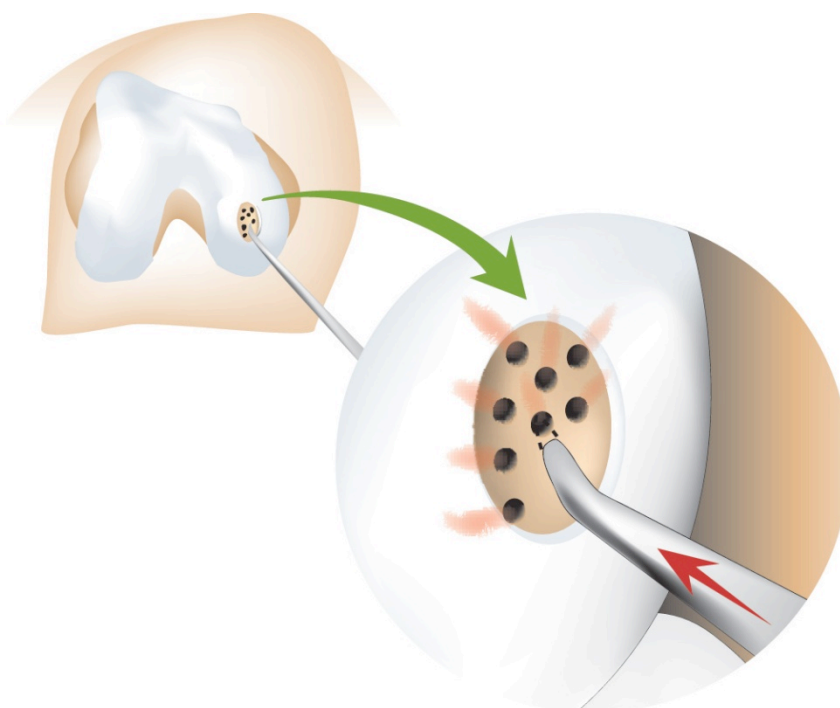
Svi reparacijski zahvati temelje se na stvaranju fibrokartilaginoznog reparata na mjestu oštećenja, i u literaturi anglosaksonskog govornog područja za ove zahvate koristimo skupni termin - stimulacija koštane moždine (engl. bone marrow stimulation). Radi se o iskorištavanju i usmjeravanju reparatnog mehanizma koji se prirodno odvija kod koštano-hrskavičnih oštećenja. Naime, preduvjet za stvaranje reparata je prekid kontinuiteta suphondralne kosti i ulazak progenitornih stanica koštane moždine u samo hrskavično oštećenje. U oštećenju se stvara ugrušak bogat progenitornim stanicama koje počinju stvarati matriks, odnosno fibrokartilaginozni reparat. Iako se ovakvo liječenje pokazalo vrlo uspješnim u smislu smanjenja bolova i poboljšanja funkcije zgloba, makromolekularna organizacija i biokemijska svojstva novostvorenog tkiva ne odgovaraju onima nativne hrskavice. Dokaz je tome veliki udio kolagena tipa I koji ne nalazimo u nativnoj hrskavici, kao i prisutnost dermatan-sulfata, proteoglikana koji nije specifičan za normalnu hijalinu hrskavicu. Morfološka i biomehanička svojstva fibrokartilaginoznog reparata nemaju kvalitetu zdrave hrskavice, a samim time i povećavaju rizik od razvoja prijevremenih degenerativnih promjena. Bez obzira na sve navedeno, tehnike stimulacije koštane moždine danas su vrlo često prva linija liječenja hrskavičnih oštećenja, i njima se postižu vrlo dobri kratkoročni i srednjeročni klinički rezultati.

Bušenje po Pridieu i abrazijska hondroplastika. Ove tehnike se danas vrlo rijetko izvode, ali su povijesno gledano vrlo važne jer su stvorile preduvjete za razvoj i

primjenu mikrofraktura koje su danas jedan od dva zlatna standarda u liječenju oštećenja hrskavice. Pridie je svoju tehniku opisao 1959. godine, a ona se sastoji u pažljivom otklanjanju svih nestabilnih dijelova hrskavice i bušenju suphondralne kosti.²² Loše strane ove tehnike su termalno oštećenje suphondralne kosti svrdlom i izostanak stimulativnog djelovanja mikrofraktura. Abrazijska hondroplastika je radikalnija varijanta bušenja po Pridieu i sastoji se u eksciziji oštećene hrskavice zajedno sa suphondralnom kosti.²³

Mikrofraktura. Radi se o modifikaciji metode bušenja po Pridieu, i danas je to vjerojatno najkorištenija metoda u liječenju hrskavičnih oštećenja. Iako su prvi ovu metodu opisali Rodrigo i suradnici²⁴ koji su je koristili u kombinaciji s debridmanom, zasluge za detaljan opis tehnike kao i popularizaciju metode pripadaju Steadmanu i suradnicima²⁵. Cijeli se zahvat izvodi artroskopski, a prvo je potrebno pripremiti oštećenje na način da se kohlejom odstrani sva nestabilna hrskavica, a rubovi oštećenja, odnosno zdrave hrskavice moraju biti okomiti na suphondralnu kost. Potom se uz pomoć specijalnog dlijeta u suphondralnoj kosti stvaraju kontrolirane frakturne rupe, i to na način da su pojedine rupe međusobno udaljene 3-4 mm (slika 3.). Osobito je važno sačuvati integritet suphondralne ploče, i ne dozvoliti međusobno spajanje frakturnih rupa. Oštećenje se potom puni tzv. super-ugruškom, koji stvara optimalne uvjete za diferencijaciju progenitornih stanica koštane moždine i stvaranje stabilnog reparata. Nakon samog zahvata slijedi podjednako važan dio liječenja a to je rehabilitacija. Protokol se sastoji od ranog pasivnog gibanja zgloba, ali striktno bez opterećenja. Prednosti mikrofraktura u odnosu na bušenje su odsutstvo termalnog oštećenja, te stimulatorni učinak samih fraktura koje potiču lučenje bioaktivnih molekula koje usmjeravaju stanični odgovor progenitora iz koštane moždine. Također valja napomenuti kako se radi o relativno jednostavnoj tehnici koja, osim mikrofrakturnih dlijeta ne zahtjeva dodatan instrumentarij. Obično se izvodi kao

jednodnevni artroskopski zahvat, i bolesnici isti dan odlaze na kućno liječenje. Povratak aktivnostima dnevnog života, kao i povratak sportu relativno je brz, a u prilog tome govore i podaci američke studije koja je pokazala da se čak 76% profesionalnih igrača američkog nogometa vratilo u sastav već slijedeću sezonu nakon ozljede.²⁶ Literaturni podaci govore u prilog učinkovitosti ove metode, osobito u kratkoročnom i srednjeročnom razdoblju praćenja (5 do 7 godina).^{27,28} Randomiziranom, kontroliranom studijom provedenom u četiri sveučilišne bolnice, u Norveškoj su uspoređene dvije tehnike – mikrofrakture i autologna transplantacija hondrocita.^{29,30} Rezultati su pokazali kako je 77% bolesnika iz obje grupe zadovoljno ishodom operacije nakon 5 godina. Također valja napomenuti kako su mikrofrakture učinkovitije kod bolesnika mlađih od 40 godina, u slučaju kada je lezija manja od 2.5 cm², te kada je indeks tjelesne mase bolesnika manji od 30 kg/m².^{31,32,33}



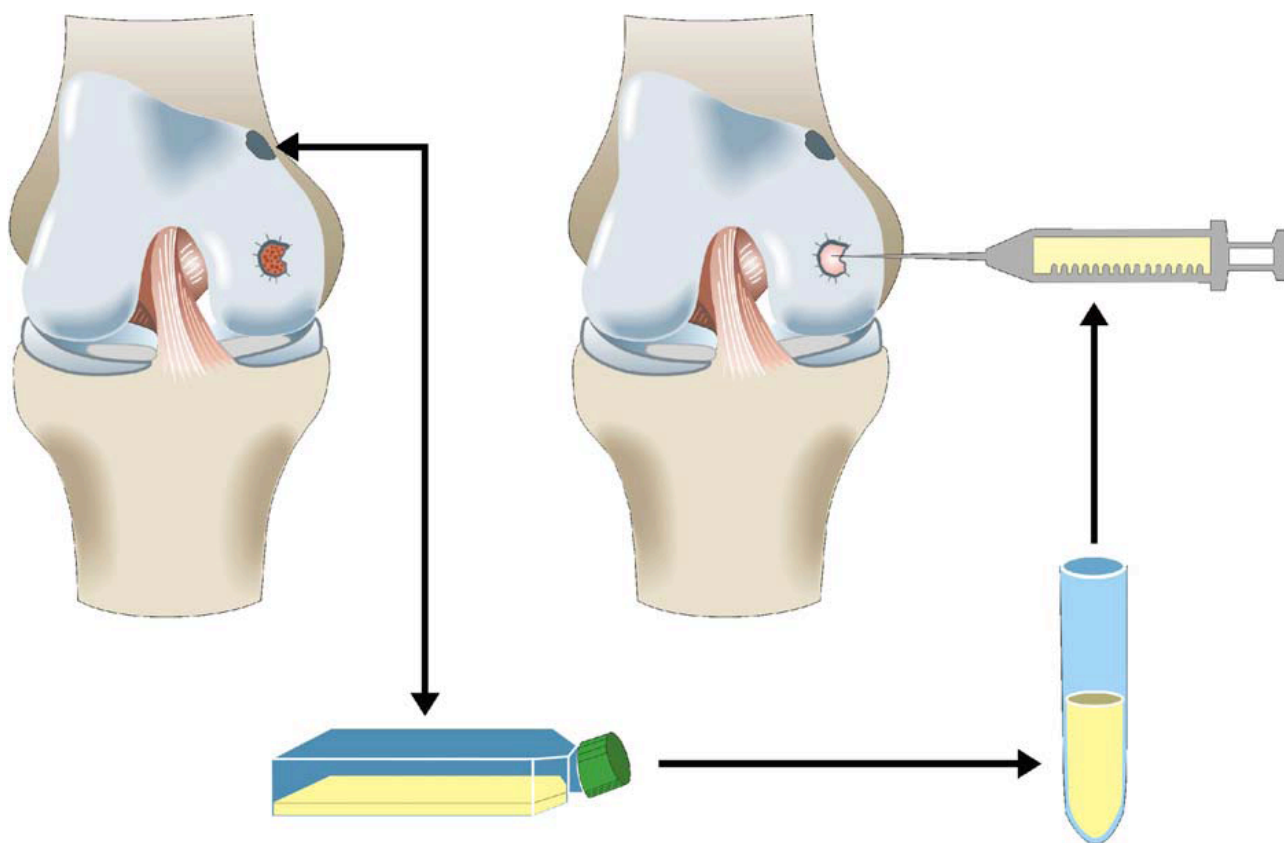
Slika 3. Shematski prikaz izvođenja mikrofrakture.

1.4.3. Regeneracijski princip liječenja oštećenja zglobne hrskavice

Cilj zahvata koje svrstavamo u ovu skupinu jest stvaranje hijaline hrskavice koja bi, u idealnoj situaciji svojim morfološkim i biomehaničkim osobinama bila identična nativnoj hrskavici. Iako za sada ovaj ideal nije dostignut, postojeće regeneracijske metode temelje se na biološkim principima i stvoreno tkivo puno je histološki sličnije zdravoj hijalinoj hrskavici. Za uspješnu regeneraciju hrskavice potrebno je u oštećenje ubaciti dovoljan broj stanica, potreban je biološki signal koji će stanice potaknuti na hondrogenu diferencijaciju, te nosač koji će stanicama omogućiti trodimenzionalni smještaj unutar oštećenja. Trenutačno najkorištenija metoda iz ove skupine je autologna transplantacija hondrocita (ATH), koja se uz mikrokfrakture smatra zlatnim standardom u liječenju hrskavičnih oštećenja. Iako ne zadovolja u potpunosti sve kriterije da bismo je nazvali regeneracijskom tehnikom, mozaikplastika je metoda koja dovodi koštano i hrskavično tkivo u oštećenje, pa će stoga i ona biti opisana u ovom dijelu.

Autologna transplantacija hondrocita (ATH). Prvi puta je ova metoda opisana još 1984. kada su Peterson i suradnici³⁴ objavili primjenu tehnike na modelu kunića, a 10 godina kasnije ista ekipa autora u prestižnom New England Journal of Medicine objavljuje rezultate primjene ove metode kod ljudi.³⁵ Ovaj događaj označava početak potpuno nove ere u ortopediji, obzirom da je prvi puta primjenen tkivni inženjering u liječenju bolesti i ozljeda sustava za kretanje. Liječenje ovom metodom se provodi u dva akta (slika 4.). Najprije se artroskopski uzme komadić zdravog tkiva iz dijela koljena koji je pod manjim opterećenjem. Uzorak se potom šalje u specijalizirane laboratorije gdje se enzimatskim putem matriks odvaja od samih stanica, te se stanice umnožavaju i do 30 puta. U drugom aktu se te stanice vraćaju na mjesto samog oštećenja koje se prekriva periostom uzetim s proksimalne potkoljenice. Periost se potom zašije transkartilaginoznim šavovima i zalijepi

fibrinskim ljepilom kako bi se od oštećenja napravila vodonepropusna bioaktivna komora u kojoj transplantirani hondrociti počinju stvarati izvanstanični matriks. Ideja ove metode je stvaranje hijaline hrskavice, a ne fibrokartilaginoznog reparata. Brittberg i suradnici³⁵ su prikazali rezultate liječenja prva 23 bolesnika u vremenu praćenja od 39 mjeseci. U njihovoj seriji dobri i odlični klinički rezultati postignuti su u 70% slučajeva. Biopsija učinjena na mjestu transplantacije pokazala je prisutstvo tkiva “sličnog hijalinoj hrskavici” (engl. hyaline-like cartilage) u 11 od 15 slučajeva.



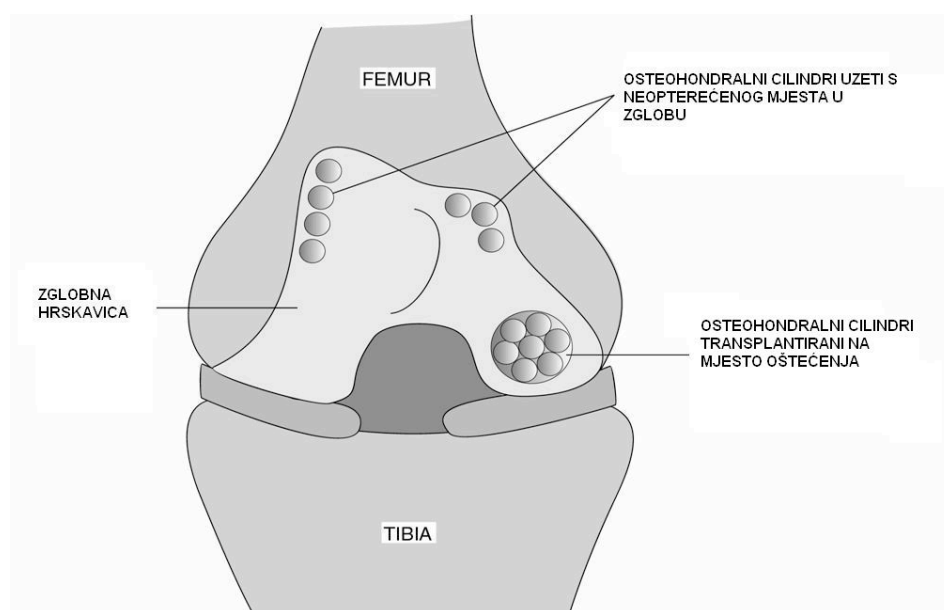
Slika 4. Shematski prikaz autologne transplantacije hondrocita.

Recentniji rad istih autora pokazuje dobre kliničke rezultate u vremenu praćenja do 11 godina.³⁶ Iako se puno očekivalo od ove metode ipak su histološke analize pokazale da

novostvoreno tkivo još uvijek ne dostiže kvalitetu native hrskavice. Jedno od mogućih objašnjenja je i opservacija da se hondrociti tijekom *in vitro* umnožavanja dediferenciraju u fibroblaste, što znači da osim samih hrskavičnih stanica u oštećenje vraćamo obične fibroblaste koji potom stvaraju kolagen tipa I umjesto kolagena tipa II. Nedavno su Saris i suradnici³⁷ testirali modificiranu metodu ATH koja koristi tzv. karakterizirane hondrocite koji se dijele samo 4 puta, nakon čega se na temperaturi od 4°C prenose do bolnice i transplantiraju u oštećenje. Kontrolirana i randomizirana studija kojom su uspoređivali ATH i mikrofrakture je pokazala kako u histomorfometrijski rezultati novostvorenog tkiva puno bolji kod ATH, dok su klinički rezultati podjednaki za obje grupe. Obzirom na činjenicu kako je ATH vrlo skupa metoda, kako su potrebna dva zahvata, i kako je značajno invazivnija od mikrofrakture opravdano je pitanje isplativosti ovakvog načina liječenja. Također treba naglasiti kako se ovom metodom u oštećenje stavljaju samo stanice dok izostaje biološki signal, kao i nosač koji bi omogućio trodimenzionalni smještaj samih stanica.

Mozaikplastika (osteohondralni transfer). Prvi puta opisana 1993., mozaikplastika je danas etablirana metoda liječenja hrskavičnih i koštano-hrskavičnih oštećenja.³⁸ Princip metode temelji se na uzimanju koštano-hrskavičnih cilindara iz jednog dijela zgloba (zdrava hrskavica iz dijela zgloba koji nosi manju težinu) i transplantaciji u samo oštećenje (slika 5.). Cilindri mogu biti različite veličine, a u pravilu koristimo više njih za popunjavanje jednog oštećenja, pa stoga i naziv tehnike u biti odražava princip liječenja i izgled oštećenja nakon liječenja. Između pojedinih cilindara stvara se fibrokartilaginozni reparat. Originalno je tehnika opisana kao otvoreni zahvat, no Hangody i suradnici su je modificirali u minimalno invazivni zahvat.³⁹ Primjenom ove metode postižu se dobri rezultati u smislu smanjenja bolova i poboljšanja funkcije zgloba.⁴⁰ Usprkos tome postavlja

se pitanje preživljenja hondrocita u cilindrima nakon transplantacije, te sposobnost hrskavice koja je uzeta iz manje opterećenog dijela zgloba da podnosi velika mehanička opterećenja. Poznato je kako je integracija novostvorenog tkiva u okolnu zdravu hrskavicu najveći problem, a ovom tehnikom upravo rubni hondrociti stradavaju, te ne dolazi do prave integracije.⁴¹ Umjesto toga između cilindara se stvara fibroartilaginozni reparat koji vremenom može dovesti do razvoja osteoartrotskih promjena.



Slika 5. Shematski prikaz izvođenja mozaikplastike.

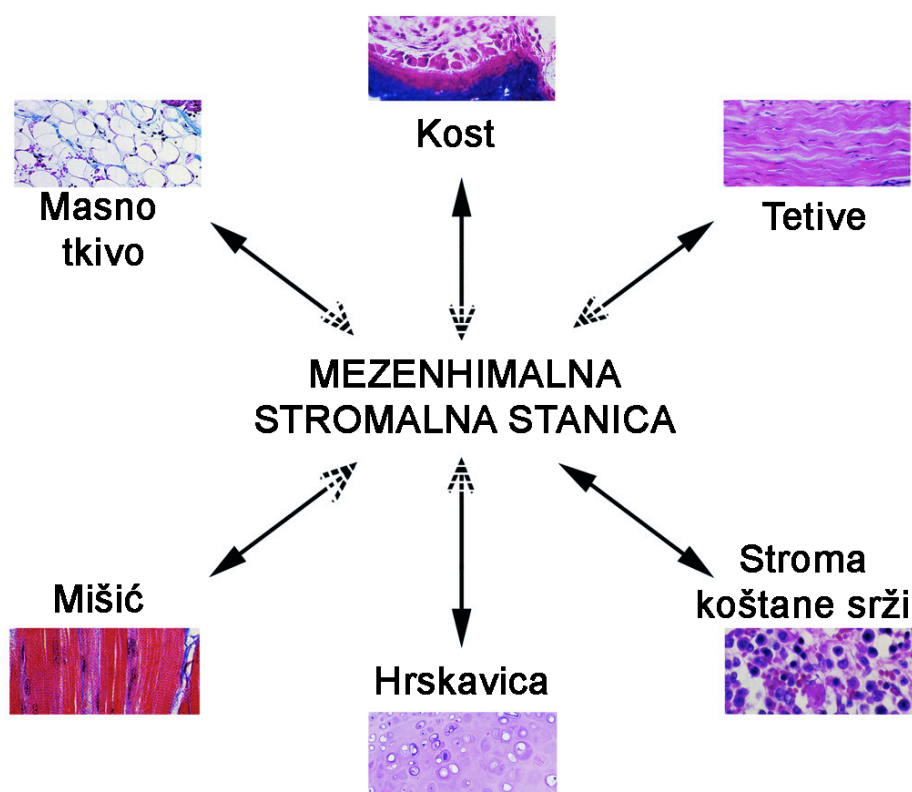
1.5. Mezenhimalne stromalne stanice

Mogućnost uporabe matičnih stanica izazvalo je pravu revoluciju u medicini u posljednjem desetljeću. Spoznaja kako su matične stanice nediferencirane, te kako se, barem teoretski mogu diferencirati u bilo koje tkivo našeg organizma, dovela je do stvaranja potpunog novog koncepta liječenja koji danas nazivamo *regenerativnom medicinom*. Iako su brojne studije pokazale kako se humane embrionalne matične stanice (hESCs, od engl. human embryonic stem cells) mogu diferencirati u kost ili hrskavicu, pred

znanstvenicima i kliničarima stoje brojne prepreke koje onemogućavaju konkretniju primjenu ovih stanica u liječenju.^{42,43,44} Obzirom kako su te prepreke ipak više etičke i moralne prirode, znanstvenici su se okrenuli istraživanju druge vrste stanica koje nazivamo postnatalnim matičnim stanicama, a prisutne su u različitim tkivima i organima čovjeka (ali i svih drugih sisavaca) nakon rođenja. Najčešće korištene stanice su one iz koštane moždine⁴⁵, periferne krvi⁴⁶, masnog tkiva⁴⁷, mišića⁴⁸, placente⁴⁹, pupkovine⁵⁰ i amnionske tekućine⁵¹.

Ortopedima su osobito interesantne mezenhimalne stromalne stanice (MSS, u engl. jeziku koristi se termin *mesenchymal stromal cell* i kratica MSC) koje su prvi opisali i karakterizirali Friedenstein i suradnici⁵². U svojim istraživanjima oni su dokazali kako je iz koštane moždine moguće izolirati fibroblastoidne stanice na osnovu njihove sposobnosti da se prilijepe za dno plastične posude. U *in vitro* uvjetima ove stanice vrlo brzo proliferiraju i od jedne stanice koja je nazvana fibroblast koji stvara kolonije (CFU-F, od engl. colony forming unit-fibroblast) nastaje čitava kolonija. Na ovaj način je moguće od vrlo malog broja mezenhimalnih matičnih stanica koštane moždine dobiti milijarde stanica. Sam termin mezenhimalna matična stanica, prvi je upotrijebio Mark Pittenger 1999. godine⁵³, koji je pokazao kako ove stanice zadržavaju stabilan fenotip kada se umnožavaju u *in vitro* uvjetima, te kako se mogu diferencirati u osteoblaste, hondroците i adipocyte (slika 6.). Međunarodno društvo za staničnu terapiju (ISCT – International Society for Cellular Therapy) je odredilo minimalne kriterije koje stanica mora zadovoljavati kako bismo je mogli nazvati mezenhimalnom stromalnom stanicom.⁵⁴ Ti kriteriji su slijedeći: MSS mora imati sposobnost adherencije za dno plastične posude u standardnim *in vitro* uvjetima. Kod MSS-a moraju biti prisutni biljezi CD105, CD73 i CD90, a moraju biti odustni biljezi CD45, CD34, CD14 ili CD11b, CD79α ili CD19 i HLA DR površinske

molekule. MSS se moraju *in vitro* diferencirati u osteoblaste, adipocite i hondroците. Iako se čini da su ovi kriteriji dobro definirani, potrebno je naglasiti kako se radi o prilično heterogenoj populaciji stanica koje nemaju telomerazu, i kod koje starenje, odnosno senescencija nastupa već nakon 30-40 djeljenja. Upravo zbog toga neki autori smatraju kako se ne radi o pravim matičnim stanicama, te ISCT 2005. godine predlaže da se termin promjeni u mezenhimalna stromalna stanica što je prikladniji naziv, a akronim MSC koji se duboko ukorijenio u anglo-američkoj literaturi ostaje isti (MSC, engl. mesenchymal stromal cell).⁵⁵



Slika 6. Multilinijski potencijal mezenhimalne stromalne stanice.

Obzirom na činjenicu kako je hondrogeni potencijal MSS-a dobro proučen, te kako ih je relativno jednostavno izolirati i ekspanirati, ove stanice predstavljavaju vrlo atraktivnu opciju u liječenju bolesti i ozljeda zglobove hrskavice.⁵⁶ U pravilu se ne upotrebljavaju same, već istraživanja idu u smjeru kombinacije MSS-a, biološkog signala i nosača. Rezultati primjene mezenhimalnih stromalnih stanica na animalnim modelima su vrlo dobri. Tako primjerice, studije provedene na modelu osteohondralnog oštećenja koljena kunića pokazuju da primjena MSS-a u kombinaciji s nosačem od polikaprolaktona⁵⁷ (PCL, engl. polycaprolacton), polilaktične kiseline⁵⁸ (PLA, engl. polylactic acid) i fibrinskog gela⁵⁹, dovodi do stvaranja hrskavice relativno slične nativnoj hrskavici, s vrlo dobrom integracijom u okolno zdravo tkivo. Slične rezultate opisuju i Mrugala i suradnici⁶⁰ na modelu osteohondralnog oštećenja trohleje ovce gdje su MSS-e aplicirane u kombinaciji s kitosanskim nosačem i transformirajućim faktorom rasta- β 3. Primjena ove metode u ljudi je još uvijek u eksperimentalnoj fazi, i za sada je objavljeno svega nekoliko serija bolesnika liječenih primjenom mezenhimalnih stromalnih stanica i biorazgradivih nosača.^{61,62} Ipak, rezultati tih studija su vrlo obećavajući obzirom da pokazuju vrlo dobre i odlične rezultate u vremenu praćenja od 5 godina, te puni povratak aktivnostima dnevnog života i sporta.

1.6. Regulacija hondrogeneze bioaktivnim molekulama

1965. godine Marshall Urist je u časopisu Science objavio svoje opažanje da implantacijom demineraliziranog koštanog matriksa u mokraćni mjehur dolazi do stvaranja ektopičnog koštanog tkiva.⁶³ Urist je molekule za koje je smatrao da su odgovorne za ektopično stvaranje kosti nazvao koštanim morfogenetskim proteinima (skraćeno BMP od engl. bone morphogenetic proteins), te započeo eru primjene bioloških signalnih molekula

u ortopediji. Danas je istraživanje primjene različitih faktora rasta, citokina i malih molekula izuzetno propulzivno područje od kojeg se puno očekuje. Trenutačno su za kliničku primjenu odobrene samo dvije molekule (BMP-2 i BMP-7), i to za liječenje otvorenih prijeloma potkoljenice, te kod operacija ukočenja kralješnice.⁶⁴ Osnovni problem korištenja bioaktivnih molekula u reparaciji i regeneraciji tkiva, bez obzira da li ih koristimo u anaboličke ili antikataboličke svrhe, je taj što se radi o proteinima koji imaju vrlo kratko poluvrijeme života, i brzo nestaju s mjesta gdje su primjenjeni. Također valja naglasiti da mnogi od ovih proteina djeluju intracelularno, što znači da ne mogu biti primjenjeni u topivom obliku.

1.6.1. Čimbenici rasta

Idealna bioaktivna molekula bi inducirala hondrogenezu i stimulirala staničnu proliferaciju i maturaciju, kao i sintezu izvanstaničnog matriksa. Upravo su čimbenici rasta odavno prepoznati kao najvažniji kandidati za ovaj proces (tablica 2.).⁶⁵ Čimbenici rasta svoj učinak ostvaruju putem specifičnih receptora vezanih za staničnu membranu. Signal se potom prenosi prema jezgri putem protein kinaza i G proteina, što u konačnici dovodi do odgovora gena koji kontroliraju staničnu proliferaciju i diferencijaciju.⁶⁶ Poznato je kako članovi super-obitelji transformirajućeg čimbenika rasta- β (skraćenica TGF- β od engl. transforming growth factor- β) imaju ključnu ulogu u embriološkom razvoju koštanog i hrskavičnog tkiva.⁶⁷ TGF- β izaziva hondrogeni odgovor embrionalnih mezenhimalnih stanica, a svi *in vitro* modeli hondrogeneze kao ključan sastojak koriste upravo ovaj čimbenik rasta. Najčešće korišteni čimbenici rasta su TGF- β 1 i TGF- β 2, BMP-2 i -7, FGF-2, IGF-1, GDF-5, te PTHrP.^{68,69,70,71,72} Iako je teško sa sigurnošću točno utvrditi biološki učinak svakog pojedinog čimbenika rasta, rezultati provedenih animalnih studija

nedvojbeno su pokazali da primjena ovih citokina poboljšava histološki izgled obnovljene hrskavice. Tako je primjerice dokazano da IGF-1 i TGF- β moduliraju sintezu izvanstaničnog matriksa, a BMP-2 i -7 sudjeluju u rastu i diferencijaciji mezenhimalnih stanica u hondroblaste i osteoblaste.^{73,74,75,76}

1.6.2. Transkripcijski čimbenici

Jedna od mogućih strategija uključuje i primjenu transkripcijskih čimbenika koji djeluju na način da direktno reguliraju ekspresiju gena uključenih u hondrogenezu, primjerice onih koji kodiraju sintezu kolegena tipa II i agrekana. Na eksperimentalnim je modelima utvrđeno kako mnogi transkripcijski čimbenici imaju hondrogena svojstva, a najizgledniji su kandidati iz ove skupine Sox9⁷⁷, Cbfa1/Runx-2⁷⁸, Cart-1⁷⁹, Ets⁸⁰, kao i neke od signalnih molekula iz obitelji Wnt⁸¹ i hedgehog⁸².

1.6.3. Antikatabolički čimbenici

Inhibicija kataboličkog djelovanja određenih proupalnih citokina također je atraktivna opcija u regeneraciji i spriječavanju propadanja hrskavice. Potencijalne mete pogodne za blokiranje ovih kataboličkih procesa prvenstveno uključuju članove obitelji IL-1 (interleukin-1)⁸³, TNF (engl. tumor necrosis factor)⁸⁴ i IL-17 (interleukin-17).

Čimbenik rasta	Kost	Zglobna hrskavica	Mišići	Meniskus	Tetive i ligamenti
TGF-β		+	+	+	+
BMP-2	+	+			+
BMP-4	+				
BMP-7	+	+			+
BMP-12					+
IGF-1	+	+	+		+
bFGF	+	+	+		+
NGF			+		
PDGF	+/-		+		+
EGF	-	+/-			+
Decorin	+				

TGF-β = transforming growth factor-beta, BMP-2 = bone morphogenetic protein-2, BMP-4 = bone morphogenetic protein-4, BMP-7 (OP-1) = bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1), BMP-12 = bone morphogenetic protein-12, IGF-1 = insulin-like growth factor-1, bFGF = basic fibroblast growth factor, NGF = nerve growth factor, PDGF = platelet-derived growth factor, EGF = epidermal growth factor

Tablica 2. Najčešće korišteni čimbenici rasta u ortopediji, kao i njihov učinak na različita tkiva koštano-mišićnog sustava.

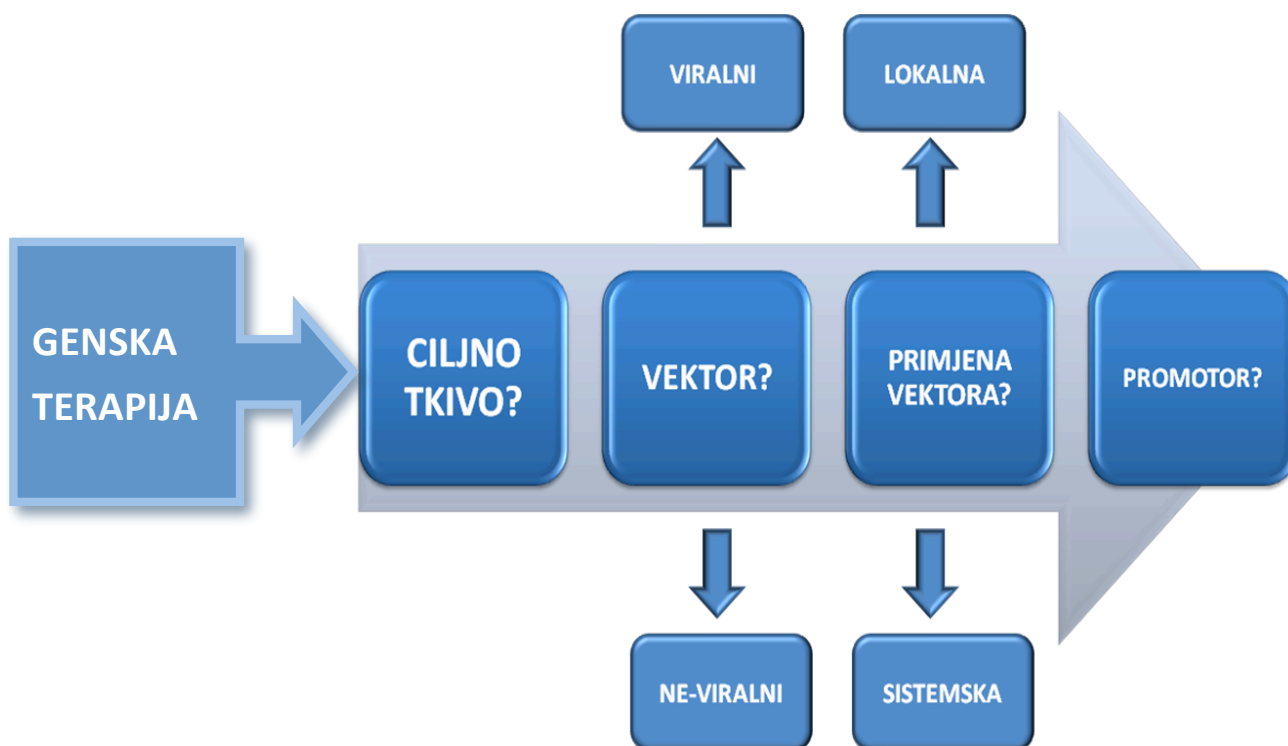
1.7. Principi primjene genske terapije

Iako se direktna primjena bioaktivnih molekula pokazala učinkovitom, njihova je klinička primjena prvenstveno limitirana poteškoćama u dovođenju i održavanju adekvatnih koncentracija tih istih molekula na mjestu cijeljenja hrskavice.⁸⁵ Zbog kompleksnosti samog procesa regeneracije hrskavice, potrebna je barem neko vrijeme stalna koncentracija bioaktivnih molekula. Također se pokazalo da je kratak biološki poluživot dodatni limitirajući čimbenik. Kako bi se premostile ove poteškoće primjenjivani su različiti

nosači, pumpe i heparin kako bi se postigle i održale adekvatne koncentracije čimbenika rasta.⁶⁹ Iako su postignuta određena poboljšanja u dostavi i održavanju koncentracije citokina, krajnji ishod nije niti iz daleka zadovoljavajući.

Pojavom nove tehnologije kojom je omogućen prijenos gena, pojavila se jedinstvena mogućnost da se gore navedeni problemi u lokalnoj primjeni bioaktivnih molekula riješe.^{86,87} Prema definiciji genska terapija je tehnika kojom se mijenja stanična genska informacija.⁸⁸ Ukoliko gene prenosimo viralnim vektorima tada ovaj proces nazivamo *transdukcija*, a ako se prenose ne-viralnim vektorima nazivamo ga *transfekcija*. Povijesno gledano prvi je puta genska terapija primjenjena još početkom 90-ih u liječenju X-vezane teške kombinirane imunodeficijencije (X-SCID, engl. X-linked severe combined immunodeficiency syndrome), kod koje je mutiran gen za kodiranje gama lanca receptora za interleukine -1, -4, -7, -9 i -15, a koji je ključan u ranom sazrijevanju T limfocita.⁸⁹ *Ex vivo* metodom, u CD34⁺ stanice oboljelih je retroviralnim vektorom ubačen gen za kodiranje gama lanca, a one su potom transplantirane bolesniku. Iako logičan izbor u liječenju monogenских nasljednih bolesti poput navedene imunodeficijencije, sistemska genska terapija ima svoja ograničenja. Primjerice potrebno ju je primjenjivati doživotno, javlja se sistemski imunološki odgovor na primjenu virusa, a postoji i rizik od razvoja malignih oboljenja zbog upotrebe retroviralnog vektora. Također valja napomenuti kako je u ortopediji tek jedan mali dio bolesti posljedica mutacije samo jednog gena, a okolišni faktori vrlo često imaju važniju ulogu od samog naslijeđa. S druge strane u slučaju reparacije i regeneracije tkiva mišićno-koštanog sustava potrebna je kratkotrajna i ograničena ekspresija gena za kodiranje bioaktivnih molekula koje moduliraju i usmjeravaju stanični odgovor na samom mjestu oštećenja. Upravo ta spoznaja dovela je do prave eksplozija istraživanja koje su za cilj imala optimizirati primjenu lokalizirane

genske terapije u cijeljenju tkiva mišićno-koštanog sustava. Prema tome, pitanja ključna za razumijevanje primjene lokalizirane genske terapije u ortopediji su: koju molekulu upotrijebiti, koje stanice ciljati, na koji način dostaviti gen u ciljne stanice, i koji promotor koristiti (slika 7.)? Obzirom kako je pitanje odabira bioaktivne molekule detaljno razrađeno u prethodnom poglavlju, potrebno je osvrnuti se na odabir vektora, ciljne stanice i promotora, kao i na odabir strategije kako spojiti sve ove komponente u smisleni protokol liječenja.



Slika 7. Shematski prikaz dizajna protokola za primjenu genske terapije.

1.7.1. Vektori

Vektori čine integralni dio svakog protokola genske terapije, i možemo ih definirati kao sredstvo kojim se služimo da bi ostvarili prijenos gena u ciljnu stanicu ili tkivo. Ne

postoji idealan vektor za sve bolesti i stanja, već ga odabiremo u odnosu na specifične potrebe samog protokola. Osnovna podjela vektora je na viralne i ne-viralne vektore.

Viralni vektori. Upotrebom viralnih vektora iskorištavamo milijune godina evolucije koje su divljim tipovima virusa omogućile da inficiraju stanice domaćina, iskoriste staničnu "tvornicu" i proizvode nove virione. Upravo zbog činjenice kako je prijenos gena u stanicu domaćina dio njihovog prirodnog životnog ciklusa, viralni vektori su daleko učinkovitiji od ne-viralnih, i njihovom je upotrebom moguće postići daleko veću transdukciju ciljnih stanica, a samim tim i ekspresiju terapijskog gena. Kako bi se izbjegla patogenost virusa, oni se modificiraju na način da mogu ulaziti u stanicu i integrirati svoju DNA uputu u citoplazmu ili jezgru, ali ne mogu se replicirati i stvarati nove kopije. Na žalost veća učinkovitost ima i svoju cijenu, a to je imunološki odgovor na prisutnost virusa, citotoksičnost, te rizik od aktivacije onkogena uslijed integracije nekih tipova virusa u genom stanice. Najčešće korišteni viralni vektori su adenovirus i adeno-sličan virus (engl. adeno-associated virus), a spomenuti valja još i herpes simplex, lentivirus i retrovirus (tablica 3.).⁹⁰

Ne-viralni vektori. Kod ove vrste vektora, u principu se služimo različitim metodama kojima uz pomoć fizikalnih ili kemijskih procedura ubacujemo terapijski gen u stanicu. Iako na ovaj nači izbjegavamo negativne strane primjene viralnih vektora kao što su imunološki odgovor domaćina ili insercijska mutageneza, njima se postiže značajno slabija transfekcija, a samim tim i ekspresija željenog gena. Najčešće korišteni ne-viralni vektor je pročišćeni plazmid, odnosno gola DNA (engl. naked DNA) koja je ujedno i najjednostavnija metoda za ubacivanje gena u tkiva i stanice.⁹¹ Metoda „genskog pištolja“ (engl. gene gun delivery) uključuje taloženje DNA na čestice zlata koje se zatim pod velikim tlakom „ispucavaju“ na stanice, odnosno tkiva.⁹² Elektroporacijom privremeno

mjenjamo električni potencijal stanične membrane, te ona postaje propusna za primjerice голу DNA.⁹³ Integracija DNA u liposome je također jedan od mogućih puteva ubacivanja gena, a u novije vrijeme vrlo su intenzivna istraživanja na području sinteze molekularnih struktura koje će kontrolirano otpuštati željenu DNA.⁹⁴

Vektor	Genom	Prednosti	Mane
Adenovirus	DNA	Transducira različite tipove stanica, veliki kapacitet pakiranja gena, vrlo učinkovita transdukcija	Izaziva jak imunološki odgovor, akutna toksičnost kratkotrajna ekspresija gena
Adeno-sličan virus	DNA	Niska imunogeničnost, integrira se u genom, različiti serotipovi pokazuju razlike u afinitetu za pojedine tipove stanica	Komplicirana proizvodnja, slabija transdukcija od adenovirusa, nizak kapacitet pakiranja gena
Herpes simplex virus	DNA	Tropizam za neurone, veliki kapacitet pakiranja gena	Veliki sigurnosni rizik
Retrovirus	RNA	Integrira se u genom, niska imunogeničnost	Nespecifična integracija, transducira samo stanice koje se dijele, nizak kapacitet pakiranja gena
Lentivirus	RNA	Moguće je transducirati i stanice koje se dijele i koje su u mirovanju	Visok rizik obzirom na HIV genom, nespecifična integracija

Tablica 3. Pregled viralni vektora i njihovih najvažnijih karakteristika.

1.7.2. Ciljne stanice

Konkretno, u slučaju oštećenja hrskavice potrebno je prenijeti genski materijal za kodiranje određenih čimbenika rasta u stanice na mjestu oštećenja koje bi potom proizvodile taj specifični faktor u terapijski zadovoljavajućim koncentracijama kroz određeno vremensko razdoblje. Njihovo prisutstvo na mjestu oštećenja stimulira transducirane stanice autokrinim putem, a netransducirane stanice parakrinim putem. U liječenju hrskavičnih oštećenja tri su vrste stanica kandidati za transdukciju: mezenhimalne stromalne stanice, diferencirani hondrociti i sinoviociti.

Mezenhimalne stromalne stanice. Najčešće se koriste MSS-e izolirane iz koštane moždine i mišića, no sve je više istraživanja koja navode dobre rezultate u primjeni genske terapije na mezenhimalnim stromalnim stanicama izoliranim iz masnog tkiva. Od ostalih stanica potrebno je spomenuti periostalne i perihondralne stanice koje su također testirane u *in vitro* uvjetima kao mogući kandidati za gensku modifikaciju.^{95,96} Primjer uspješne uporabe progenitornih stanica je i transdukcija mišje embrionalne stanične linije retroviralnim vektorom s genom za kodiranje BMP-2, koje su potom u *in vitro* uvjetima pokazivale značajke hondrogenog fenotipa.⁹⁷ Transdukcija mezenhimalnih stromalnih stanica BMP-13 i TGF- β čimbenicima rasta također je inducirala hondrogenu diferencijaciju navedenih stanica.⁹⁸

Hondrociti. Hondrociti su svakako najlogičniji izbor kao ciljna stanica za transfer gena. Učinkovitost transdukcije kulture hondrocita adenoviralnim vektorima blizu je 100%, a dodatna poboljšanja mogu se postići selekcijom stanica.⁹⁹ U posljednje vrijeme je rekombinantni adeno-sličan virus (rAAV od engl. recombinant adeno-associated virus) u središtu pozornosti znanstvenika obzirom na činjenicu kako je njime moguće transducirati hondrocite koji se nalaze u samom matriksu.¹⁰⁰ Kada se direktnom metodom rAAV

primjeni na uzorcima zdrave i osteoartritične hrskavice, transgenska ekspresija se može dokazati u hondrocitima koji se nalaze u površnoj i prijelaznoj zoni hrskavice.¹⁰¹ Različite studije su pokazale kako transdukcija hondrocita genima za kodiranje IGF-1, TGF- β 1, FGF-2 ili BMP-7 dovodi do povećane stanične proliferacije i sinteze izvanstaničnog matriksa, što ove čimbenike rasta čini najizglednijim kandidatima za genski i tkivni inženjering hrskavice.^{102,103}

Sinoviociti. Sinoviociti predstavljaju interesantnu alternativu kao ciljne stanice za primjenu genske terapije. Iako su Hunziker i suradnici¹⁰⁴ još 1996. godine objavili kako sinoviociti migriraju u hondralni defekt i na taj način doprinose cijeljenju oštećenja, većina je istraživanja koje uključuju prijenos gena sinoviocitima vezana za pokušaje liječenja reumatoidnog artritisa i osteoartritisa.^{105,106} Primjer uspješne genske terapije u liječenju reumatoidnog artritisa je i prijenos gena za kodiranje specifičnog antagonista proupalnog citokina IL-1.¹⁰⁷ Radi se o molekuli IL-1Ra, a sam protokol primjene ove molekule uz pomoć genske terapije trenutačno je u fazi kliničkog ispitivanja. Iako su Nixon i suradnici¹⁰⁸ objavili studiju kojom su ispitivali mogućnost prijenosa gena za kodiranje IGF-1 sinoviocitima *in vivo*, a u cilju poboljšanja cijeljenja hrskavičnih oštećenja, za sada je ova opcija još uvijek u ranoj fazi pretkliničkog istraživanja.

1.7.3. Promotor

Nakon što je genska uputa uz pomoć vektora unesena u ciljnu stanicu, slijedeće je pitanje: kako osigurati gensku ekspresiju tog istog gena, odnosno proizvodnju terapijskog proteina iz sekvence ubačenog gena? Taj proces reguliraju sekvence genoma koje se nalaze u blizini segmenta DNA koji kodira željeni gen i nazivamo ga *promotorom*.¹⁰⁹ Primjerice, sve stanice našeg tijela nose gen za kodiranje inzulina, no

većina stanica ne dobiva podražaj za aktivaciju tog gena i promotor ostaje inaktivan. U slučaju stanica gušterače, inzulinski promotor se aktivira i stanice počinju lučiti inzulin. Najčešće korišteni promotori kod primjene genske terapije u ortopediji su oni koji aktiviraju viralnu DNA, poput citomegalovirusa (CMV) ili retrovirusa. Posebno je interesantna opcija kojom možemo regulirati „paljenje i gašenje“ promotora, te na taj način i regulirati ekspresiju gena. Primjeri uključuju promotore koji se aktiviraju na prisutnost tetraciklina, i promotore koje je moguće inducirati primjenom x-zraka.^{110,111}

1.7.4. Strategije prijenosa gena u liječenju ozljeda hrskavice

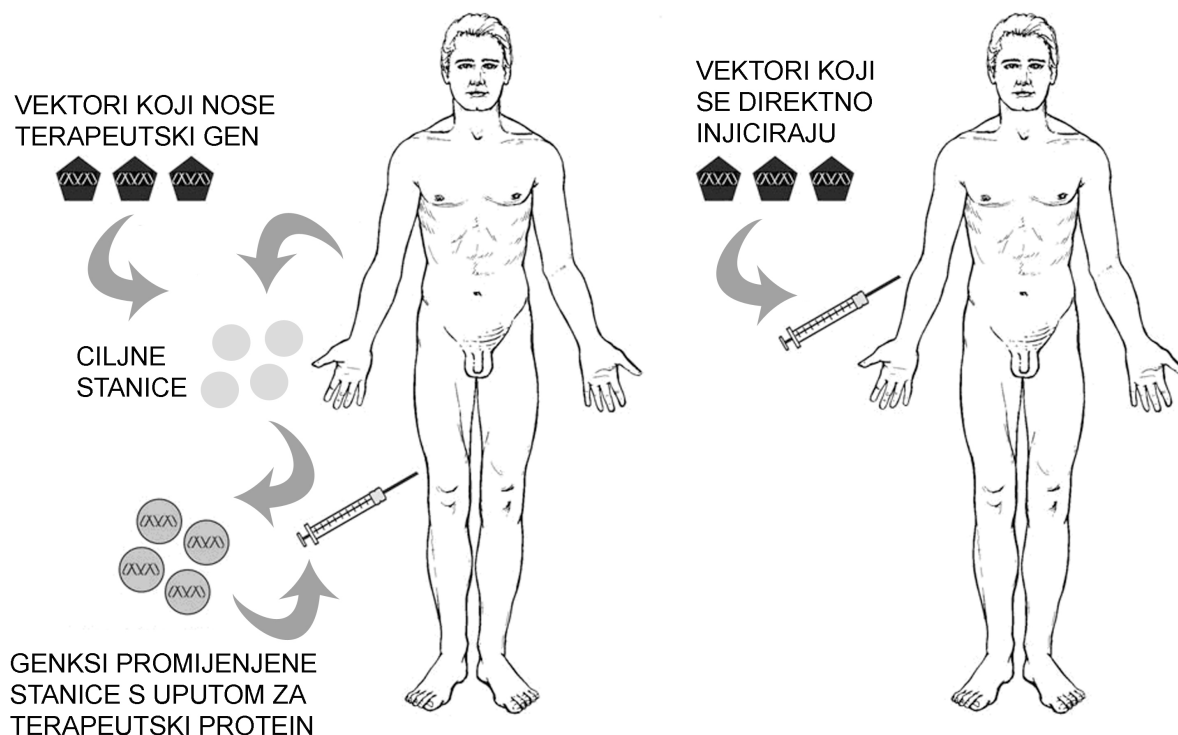
Najveća je prepreka razvoja učinkovite genske terapije u liječenju bolesti i ozljeda zglobne hrskavice nedostupnost samih hondrocita, odnosno nepostojanje adekvatnog vektora koji bi u stanice dopremio gensku uputu. Kao što je već napomenuto, hondrociti čine vrlo mali dio u ukupnom volumenu hrskavice, razbacani su unutar trodimenzionalne mreže izvanstaničnog matriksa i gotovo je nemoguće doprijeti do njih danas poznatim vektorima. Dvije su osnovne strategije primjene lokalne genske terapije u ortopediji: direktna ili *in vivo* i indirektna ili *ex vivo* genska terapija (slika 8.).

Direktna (*in vivo*) genska terapija. U ovom slučaju vektor s terapeutskim genom primjenjujemo direktno u tkivo, što bi u slučaju hrskavičnih oštećenja značilo direktno u zglob. Povijesno gledano, upravo je ovaj pristup prvi primjenjen na animalnim modelima hrskavičnih oštećenja.^{112,113} Iako se radi o najjednostavnijoj i najelegantnijoj metodi, te su studije pokazale kako je ta metoda ujedno i vrlo neprecizna. U pravilu su transducirani sinoviociti u ovojnici zgloba, dok je prijenos genskog materijala u samo oštećenje zanemariv.^{114,115} Primjerice, pokazano je da direktna intraartikularna primjena TGF- β faktora rasta dovodi do hondroblastične metaplazije sinovijalne ovojnice i teške

artrofibroze zgloba kunića.¹¹⁶ S druge strane, ekspresija IGF-1 faktora rasta od strane sinoviocita je dovela do povećane sinteze proteoglikana zglobne hrskavice, i sasvim je moguće da je ovo posljedica udaljenog parakrinog učinka sinoviocita na hondrocite.¹¹⁷ Uspješna transdukcija hondrocita u površnoj i srednjoj zoni hrskavice je opisana u studiji gdje je direktnom metodom korišten Sendai virus-liposom kompleks.¹¹⁸

EX VIVO (INDIREKTNA GENSKA) T.

IN VIVO (DIREKTNA) GENSKA T.



Slika 8. Shematski prikaz direktne i indirektne genske terapije.

Indirektna (ex vivo) genska terapija. Kod ove metode prvo se sakupljaju stanice domaćina, potom se u *in vitro* uvjetima transduciraju terapijskim genom, te se u drugom aktu vraćaju u samo oštećenje. Iako je ova metoda puno kompliciranija i skuplja od

direktne metode, mnoge druge prednosti čine je metodom izbora većine znanstvenika i kliničara koji se bave genskom terapijom hrskavice. Primjerice, indirektnom metodom možemo odabrati vrstu stanica koju želimo transducirati, možemo ispitati transgensku ekspresiju (sekreciju željenog proteina) prije vraćanja u oštećenje, a također možemo prije samog vraćanja transduciranih stanica odstraniti suvišak virusa iz suspenzije kako bismo još više smanjili mogućnost imunološkog odgovora domaćina. Indirektna genska terapija uspješno je upotrijebljena za liječenje ozljeda zglobne hrskavice uz pomoć *ex vivo* transduciranih mezenhimalnih stromalnih stanica, fibroblasta, hondrocita i sinoviocita.^{119,120}

1.8. Nosači

Pored dovoljnog broja stanica, bioaktivnog signala i biomehaničkog opterećenja, nosači (engl. scaffolds) predstavljaju nezaobilazan dio svake strategije za regeneraciju hrskavice upotrebom tkivnog inženjeringa. Njihova trodimenzionalna struktura omogućava smještaj, orijentaciju i zadržavanje stanica unutar oštećenja što odgovara staničnoj arhitektistici native hrskavice. Također je važno napomenuti da upotrebom nosača možemo izbjeći korištenje periosta, njegovo šivanje i lijepljenje fibrinskim ljepilom što je jedan od koraka kod autologne transplantacije hondrocita.

Osobine idealnog nosača. Idealan nosač trebao bi biti biokompatibilan, odnosno ne bi izazivao upalnu reakciju tkiva, a također ne bi smio biti citotoksičan za okolne stanice i tkiva. Mora biti u stanju davati strukturalnu podršku stanicama, no istovremeno bi trebao biti i biorazgradiv kako bi se vremenom njegova struktura zamjenila izvanstaničnim matriksom koji sintetiziraju stanice. Trebao bi biti propusan za stanice kako bi se mogle jednoliko razmjestiti unutar njegove strukture, te omogućavati difuziju čimbenika koji potiču staničnu proliferaciju i stvaranje izvanstaničnog matriksa. Mora biti mehanički stabilan,

osobito u početku dok stanice ne proizvedu dovoljnu količinu izvanstaničnog matriksa. S praktične točke gledišta, nosač bi trebao biti jeftin, široko dostupan, lako proizvediv, te jednostavan za manipulaciju u uvjetima rada za vrijeme kirurškog zahvata.

Tipovi nosača. Velik je broj materijala upotrijebljen za izradu različitih nosača, no sve ih možemo svrstati u četiri osnovne skupine: proteinski, ugljikohidratni, sintetski nosači, te nosači napravljeni od kompozitnih polimera (tablica 4.). Najčešće korišteni nosači spadaju u prve dvije skupine. Podaci iz literature govore kako se trenutačno u istraživanjima koriste materijali poput agaroze¹²¹, kalcijevog alginata¹²², kitosana¹²³, hijaluronskog gela¹²⁴, fibrinskog ljepila¹²⁵, poliglikolne kiseline¹²⁶, kolagena¹²⁷, te kombinacije hijaluran-kolagen¹²⁸. Iako je očigledno da postoji veliki izbor materijala za izradu nosača, niti jedan od predloženih nema mehaničku čvrstoću native hrskavice. Primjerice agarozni gelovi se smatraju najčvršćim nosačima, a procjenjuje se da posjeduju svega 13% čvrstoće native hrskavice.¹²⁹

Klinička iskustva s upotrebom nosača. U principu se nosači u kliničkoj praksi upotrebljavaju za poboljšanje metode autologne transplantacije hondrocita. Trenutačno je najkorištenija tzv. MACI metoda (eng. matrix-induced chondrocyte implantation; MACI, Verigen, Leverkusen, Njemačka) kojom se autologni hondrociti procesuiraju na identičan način kao i kod ATH-a, ali se potom stavljaju između slojeva kolagena neposredno prije same transplantacije.¹³⁰ Čitava se konstrukcija potom prenosi u hrskavično oštećenje gdje se fiksira fibrinskim ljepilom, ili u nekim slučajevima bioresorptivnim pinovima i šavima. U prospektivnoj, randomiziranoj studiji Bartlett i suradnici¹³¹ su usporedili ishode liječenja upotrebom klasične metode ATH-a i novije MACI metode, te zaključili kako nema značajnijih razlika u kliničkom, artroskopskom i histološkom ishodu liječenja usporedbom ove dvije metode. Drugi najčešće korišteni nosač je Hyalograft C (Fidia Advanced

Biopolymers, Abano Terme, Italija) koji je baziran na hijaluronskoj kiselini. Postupak izolacije autolognih hondrocita je i u ovome slučaju identičan kao i kod klasične metode, no stanice se potom apsorbiraju na hijaluronski nosač gustoćom od oko milijun stanica po cm^2 . Pretkliničke studije su pokazale kako ovaj nosač potiče održavanje hondrocitnog fenotipa sa smanjenim udjelom kolagena tip I i Sox9 čimbenika, te povećanim udjelom kolagena tipa II i agrekana.¹³² Marcacci i suradnici¹³³ su objavili rezultate prospektivne studije liječenja 125 bolesnika metodom gdje je Hyalograft C implantiran artroskopski. Nakon 3 godine praćenja 92% bolesnika je pokazalo poboljšanje od 88% mjereno subjektivnim IKDC testom.

Nosači nove generacije. Svi nosači koje danas upotrebljavamo za pretklinička istraživanja i kliničku primjenu su proizvedeni od biokompatibilnih materijala i u principu je njihova unutrašnja struktura jednolična. Obzirom na to, istraživanja u dizajniranju nosača nove generacije idu u dva osnovna smjera: bioaktivni nosači i prostorno orijentirani nosači. Bioaktivni nosači osim svoje osnovne uloge davanja strukturne podrške stanicama, luče bioaktivne molekule koje moduliraju stanični odgovor, odnosno potiču proliferaciju stanica i sintezu izvanstaničnog matriksa. Primjer za ovakav nosač je inkorporacija IGF-1 u fibrinski ugrušak koji je testiran na modelu hrskavičnog oštećenja konja.¹³⁴ Prostorno orijentirani nosači imaju unutrašnju strukturu koja više sliči organizaciji native hrskavice. Primjerice Zehbe i suradnici¹³⁵ su konstruirali hidrogelni nosač sa strukturom pora i kanala koji su omogućili kolumnarnu distribuciju stanica, upravo kao što je to slučaj u dubokom sloju native hrskavice.

TIPOVI NOSAČA	GLAVNI PREDSTAVNICI
Proteinski	Kolagenski Fibrinski Želatinski
Ugljikohidratni	Hijaluronski Agarozni Alginatni Polilaktična kiselina Poliglikolna kiselina
Sintetski	Karbonski Teflon Dacron Hidroksiapatit Polimaslačna kiselina Bioaktivno staklo
Kompozitni polimeri	Kemijskim modifikacijama i križnim povezivanjem mijenjaju se svojstva raznih polimera kako bi se poboljšali

Tablica 4. Pregled osnovnih tipova nosača koje koristimo u svrhu tkivnog inženjeringa u ortopediji.

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Temeljna hipoteza ovog rada jest da je uporabom adenoviralnog vektora koji nosi gen za kodiranje transformirajućeg čimbenika rasta- β 1 (TGF- β 1) moguće uspješno transducirati stanice autologne koštane moždine, koje se potom u obliku ugruška implantiraju na mjesto hrskavičnog oštećenja. Stanice počinju proizvoditi TGF- β 1 koji inducira i usmjerava diferencijaciju tih istih stanica u hondrogenom smjeru, a te iste stanice potom stvaraju izvanstanični matriks i dovode do cijeljenja hrskavičnog oštećenja tkivom koje je svojom kvalitetom bolje od onog stvorenog bez uporabe genske terapije, odnosno od onog stvorenog samo umetanjem stanica koštane moždine. Ciljevi istraživanja su:

1. Transducirati stanice autologne koštane moždine adenoviralnim vektorom koji nosi uputu za kodiranje TGF- β 1 ili zelenog fluorescentnog proteina (GFP, egl. green fluorescent protein)
2. Histološkim, biokemijskim i biomehaničkim mjerenjima ispitati kvalitetu hrskavice stvorene na mjestu oštećenja
3. Stvorenu hrskavicu usporediti s normalnom hijalinom hrskavicom
4. Dokazati prisutstvo ili odsutstvo viralnog vektora u stanicama sinovijalne ovojnice
5. Simulirajući uvjete u operacijskoj sali, ispitati mogućnosti praktične primjene navedenog protokola u liječenju oštećenja hrskavice

3. MATERIJALI I METODE

Provedeno istraživanje dio je projekta koji financira Ministarstvo znanosti i tehnologije RH (projekt broj 108-00000003652: Genska terapija mineraliziranih tkiva; voditelj projekta: akademik Marko Pećina), a koji je odobren od strane Etičkih povjerenstava Medicinskog i Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1. Eksperimentalne životinje i kirurški zahvat

Istraživanje je provedeno na 28 ovaca u dobi od 1 do 3 godine koje su slučajnim odabirom podijeljene u četiri grupe. Sve ovce su prije operacije podvrgnute vitaminizaciji i dehelmintizaciji, a neposredno prije samog zahvata provedena je i antibiotska profilaksa cefuroksimom (Ketocef, Pliva, Zagreb, Hrvatska). Sve su životinje testirane na uobičajene zoonoze, a rezultati testova su bili negativni. Operacije su vršene na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u suradnji s djelatnicima Klinike.

Sve su operacije vršene u aseptičkim uvjetima, uz endotrahealnu anesteziju pod nadzorom anesteziologa (slike 9. i 10.). 18 sati prije zahvata životinje su prestale dobivati hranu, a pristup vodi je ukinut 8 sati prije same operacije. Premedikacija je započeta primjenom 0.1 mg/kg xylazina (Xylapan, Vetoquinol, Bern, Švicarska), a postavljen je i venski put za primjenu lijekova. Uvod u anesteziju je obavljen intravenoznom (i.v.) primjenom 2.5% otopine natrijevog tiopentala (Thiopental, Nycomed, Ismaning, Njemačka) u dozi od 5 mg/kg u bolusu. Lijek je primjenjen do trenutka kada je došlo do relaksacije čeljusti životinje, te je postavljena endotrahealna anestezija. Inhalacijska anestezija je održavana primjenom mješavine izoflurana (Forane, Abbott, Queenbrough, Velika Britanija) i kisika. Životinje su održavane na spontanoj ventilaciji s prosječnim parcijalnim

tlakom CO₂ (pCO₂) između 35 i 45 mm Hg. U slučaju povišenja pCO₂ započeta je mehanička ventilacija. Preoperacijska analgezija provedena je primjenom lidokaina (Lidokain 2%, Belupo, Koprivnica, Hrvatska) i.v. u dozi 4 mg/kg i morfina (Morphine, Alkaloid, Skopje, Makedonija) u dozi od 0.1mg/kg epiduralno u lumbosakralni intervertebralni prostor.



Slika 9. Uvod u anesteziju i endotrahealna intubacija ovce



Slika 10. Sterilno pokrivanje i priprema operacijskog polja

Na svim je ovicama operirano desno koljeno standardnim, medijalnim, parapatelarnim pristupom, a operirali su isti članovi tima. Hrskavična oštećenja promjera 6.2 mm učinjena su uz pomoć standardnog instrumenta za mozaikplastiku (Smith & Nephew Inc., Andover, MA, USA), i to na nosivoj površini medijalnog kondila femura (slika 11.). Osobito se pazilo da oštećenja budu iste dubine, te da budu isključivo hrskavična, bez oštećenja suphondralne kosti. Za vrijeme operacije na koljenu, kod životinja iz druge, treće i četvrte grupe, posebnim iglama za punkciju Trapsystem®Set (H-S Medical, Inc., Boca Raton, FL, SAD) aspirirano je iz desnog grebena ilijačne kosti 3 ml koštane moždine. Kod životinja iz druge grupe koštana moždina je primjenjena bez promjene, dok je kod životinja iz treće i četvrte grupe pomiješana s već pripremljenom suspenzijom adenoviralnog vektora (koncentracija 10^{10} viralnih čestica) s genom za TGF- β 1 ili GFP.

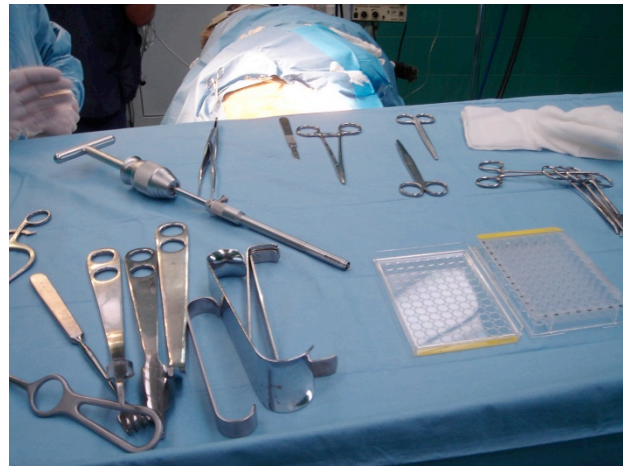
3.2. Primjenjeno sredstvo i način primjene

3.2.1. Priprema adenoviralnog vektora s uputom za kodiranje TGF- β 1 i GFP (Ad.TGF- β 1 i Ad.GFP)

Prva generacija rekombinantnog vektora dobivena je od adenovirusa serološkog tipa 5 koji je deplecijom E1 i E3 lokusa modificiran tako da zadržava mogućnost infekcije ali ne i replikacije, i to metodom koju su opisali Hardy i suradnici.¹³⁶ Adenoviralni vektor je umnožen na 293-CRE8 stanicama, te pročišćen na CsCl gradijentu između 1.2 i 1.4 g/ml tri puta uzastopno. Potom je suspenzija dijalizirana u 10mM Tris-HCL, pH 7.8, 150 mM NaCl, 10mM MgCl₂ i 4% sukrozi. Titar virusa je određen mjerenjem optičke gustoće, a alikvoti virusa su bili pohranjeni na -80°C



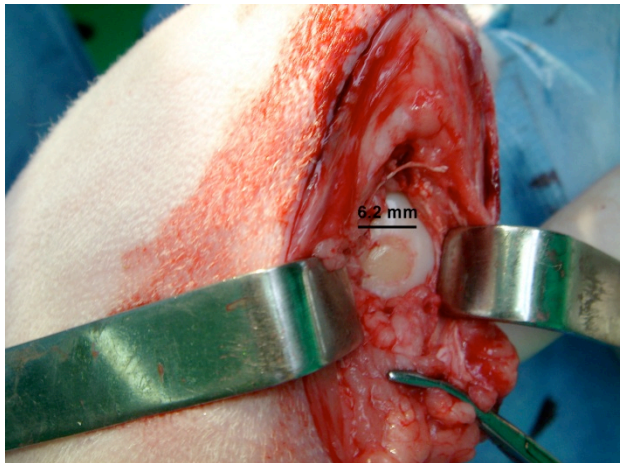
A



B



C



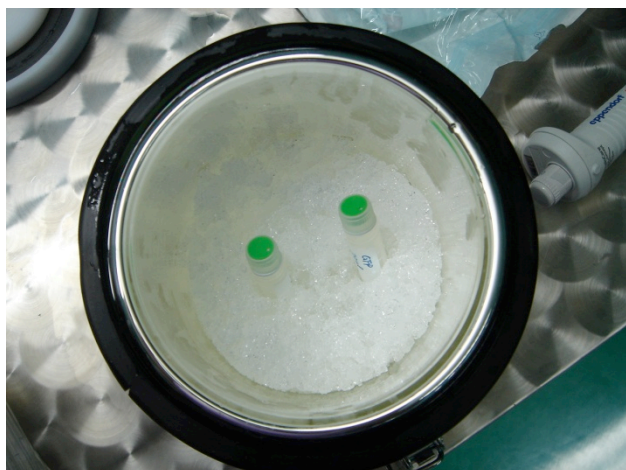
D

Slika 11. A,B) Sastavljanje instrumenta za mozaikplastiku kojim su napravljena oštećenja; C) Promjer učinjenog oštećenja na medijalnom kondilu dodatno se provjerava pomičnom mikrometarskom mjerkom; D) Hrskavično oštećenje spremno za transplantaciju ugruška koštane moždine

3.2.2. Priprema genski promijenjenog ugruška autologne koštane moždine

3 ml koštane moždine dobiveno je na način opisan u prethodnom odlomku. Uz pomoć 1-militarske pipete alikvoti od 250 μ l brzo su pomiješani s 25 μ l suspenzije Ad.TGF- β 1 ili Ad.GFP u koncentraciji od 10^{10} viralnih čestica po mililitru (slika 12.). Mješavina je ostavljena na sobnoj temperaturi 5 minuta kako bi se koštana moždina zgrušala, da bi potom ugrušak bio transplantiran u pripremljeno oštećenje (slika 13.). Ponovno je ugrušak

ostavljen u oštećenju tijekom 5 minuta, provjerena je stabilnost, zglob je ispran fiziološkom otopinom i zašiven po slojevima.



A



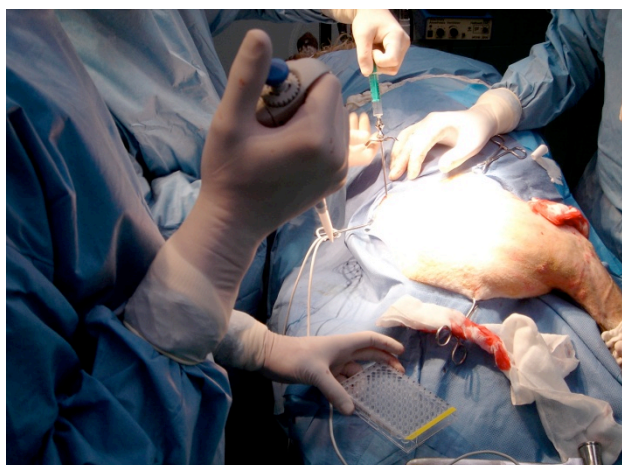
B

Slika 12. Adenoviralni vektor. A) Adenoviralna suspenzija spremna za primjenu B) Alikvoti viralne suspenzije raspoređuju se u 96-rupičnoj ploči

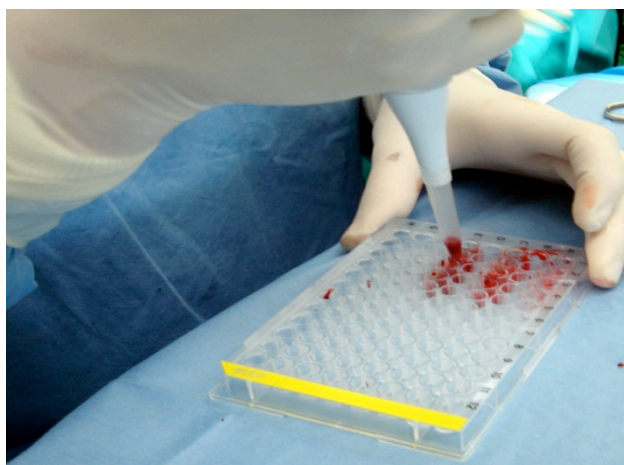
3.2.3. Istraživački postupnik i priprema preparata za analize

28 ovaca slučajnim je odabirom podijeljeno u 4 ispitivane grupe (slika 14.). Prva skupina (**skupina CON**) je negativna kontrola i sastoji se od 6 ovaca kod kojih je napravljeno hrskavično oštećenje na medijalnom kondilu desnog femura (ukupan broj oštećenja $n=6$)(slika 14.). Druga skupina (**skupina BMC**) također se sastoji od 6 životinja, no u oštećenje na medijalnom kondilu desnog femura je transplantiran ugrušak autologne koštane moždine (ukupan broj oštećenja $n=6$). Ova skupina služi kao pozitivna kontrola, obzirom da se u biti radi o postupku koji odgovara mikrofrakturama. Treća skupina (**skupina GFP**) se sastoji od 6 ovaca, a u oštećenje na medijalnom kondilu desnog femura (ukupan broj oštećenja $n=6$) transplantiran je ugrušak autologne koštane moždine pomiješan s adenoviralnim vektorom koji nosi gen za kodiranje zelenog fluorescentnog

proteina. Obzirom da se radi o proteinu koji nema utjecaja na diferencijaciju stanica, ovu grupu također smatramo pozitivnom kontrolom, a cilj je dokazati kako sama metoda transdukcije nema utjecaja na kvalitetu stvorenog reparata.



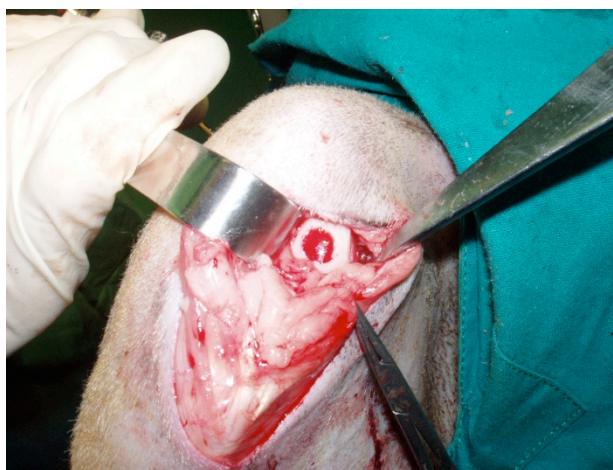
A



B



C

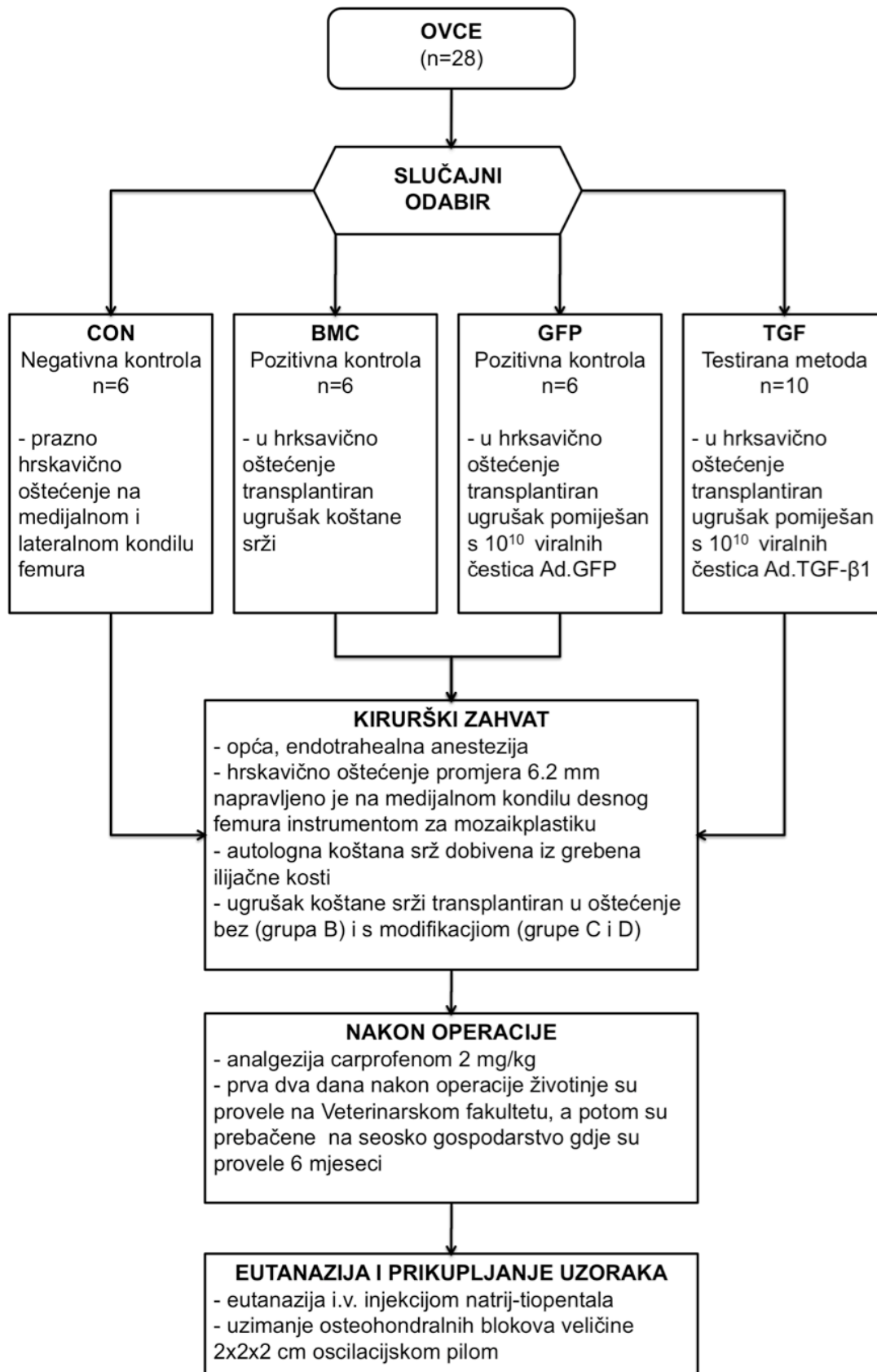


D

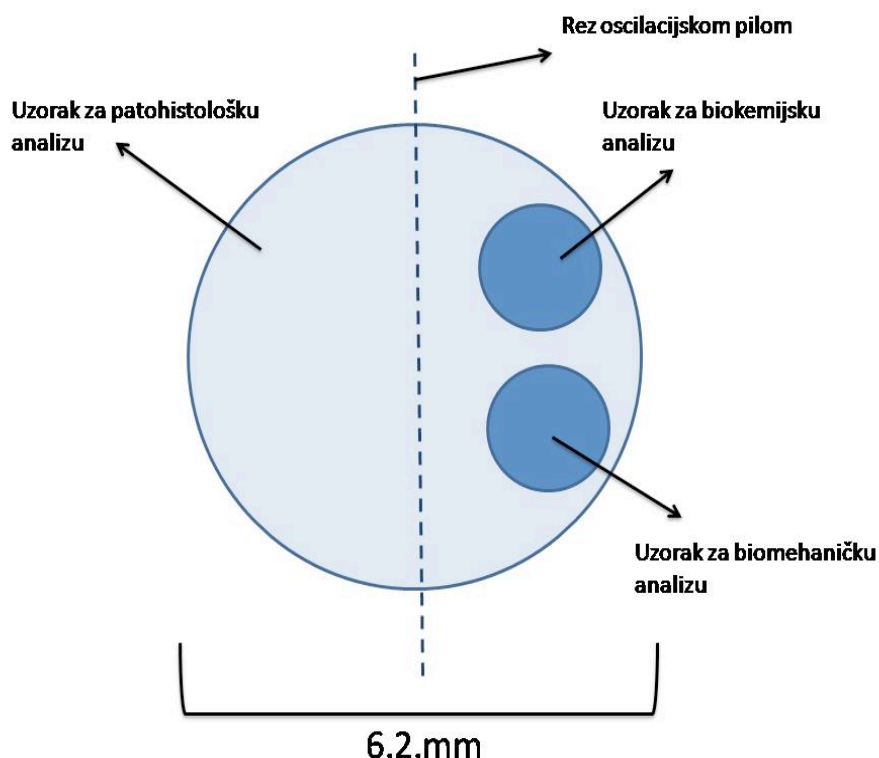
Slika 13. Transdukcija i transplantacija autologne koštane moždine. A) Aspiracija autologne koštane moždine iz grebena ilijačne kosti B) Mješanje koštane moždine s adenoviralnim vektorom C) Transplantacija ugruška u pripremljeno oštećenje D) Stabilan ugrušak u hrskavičnom oštećenju nesporedno prije zatvaranja zgloba.

Četvrta skupina (**skupina TGF**) se sastoji od 10 ovaca, a u oštećenje na medijalnom kondilu femura je transplantiran ugrušak autologne koštane moždine pomiješan s virusnim vektorom koji nosi gen za kodiranje TGF- β 1. U ovoj grupi ispituje predloženu metodu. Rano poslijeoperacijsko razdoblje životinje su provele pod nadzorom osoblja u za to predviđenim prostorima Klinike kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta. Postoperacijska analgezija provdena je carprofenom (Rymadil, Pfizer Animal Healthcare, Exton, PA, SAD) u dozi 2 mg/kg. Nakon dva dana životinje su prebačene na seosko domaćinstvo gdje su pod nadzorom doktora veterinarske medicine provele 6 mjeseci.

Nakon 6 mjeseci ovce su žrtvovane letalnom injekcijom natrij-tiopentala od strane doktora veterinarske medicine. Kroz stari rez se prvo pristupilo na operirano koljeno i oscilacijskom pilom je uzet osteohondralni blok veličine 2 x 2 x 2 cm na kojem se nalazi i mjesto oštećenja. Potom se isti takav uzorak uzme s kotralateralnog neoperiranog koljena s istog mjesta na kondilu. Osteohondralni blok se prepili na pola, te se uzorci za analizu prikupe kako je prikazano na slici 15. Jedna polovica se spremi za patohistološku analizu, a iz druge polovice se uzmu dva cilindra promjera 2 mm, od kojih se prvi spremi za biokemijsku analizu, a drugi za biomehaničku analizu. Iz suprapatelarnog recesusa se uzme komadić sinovije za analizu metodom PCR (engl. polymerase chain reaction).



Slika 14. Shematski prikaz podjele eksperimentalnih životinja po skupinama i protokola samog istraživanja.



Slika 15. Shema uzimanja uzoraka za histološku, biokemijsku i biomehaničku analizu.

3.4. Mikroskopska analiza hrskavice

Po žrtvovanju eksperimentalnih životinja i uzimanju osteohondralnih uzoraka s medijalnog kondila pristupalo se pripremi preparata za patohistološku analizu u Zavodu za histologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nakon ispiranja u PBS mediju tkivo je fiksirano u 4% puferiranom paraformaldehidu te uklopljeno u parafin. Tako uklopljeni preparati rezani su na debljinu od 5 mikrometara, naliježljeni na silanizirana predmetna stakla, te bojani hemalaun-eozinom (HE). Dodatni rezovi bojani su metodom

safranin-O, odnosno bojom koja se specifično veže za glikozaminoglikane zglobne hrskavice. Šifrirane histološke preparate pregledala su pod svjetlosnim mikroskopom dva neovisna histologa u Zavodu za histologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Kvaliteta stvorenog tkiva analizirana je primjenom semikvantitativne vizualne histološke metode - *ICRS Visual Histological Assessment Scale* (ICRS – International Cartilage Research Society).¹³⁷ Ovom metodom boduje se 6 osnovnih kategorija: površina, matriks, distribucija stanica, vijabilnost stanica, suphondralna kost i mineralizacija hrskavice. Detalji skora prikazani su u tablici 5. Obrada uzoraka bojenih različitim tehnikama učinjena je sustavom koji se sastoji od svjetlosnog mikroskopa te osobnog računala sa sustavom za pohranu i analizu slike. Kvantitativni parametri analizirani su na tri konzekutivna reza, i to pod povećanjem objektiva x 40, i x 100.

3.5. Biokemijska analiza hrskavice

Uzorci hrskavice prikupljeni metodom opisanom u prethodnom odlomku su spremljeni na -80°C do same analize. Suha i mokra težina uzoraka izmjerene su prije i poslije smrzavanja. Uzorci su razgrađeni upotrebom tripsina i biokemijski obrađeni metodom koju su nedavno opisali Dickinson i suradnici¹³⁸.

Svaki je uzorak smrvljen u tekućem dušiku kako bi se dobile fine čestice hrskavice. Goveđi pankreatički tripsin je pripremljen u koncentraciji od 2mg/ml u Tris puferu (pH 7.5), koji je sadržavao 1mM jodoacetamida, 1mM etilenediaminetetraacetične kiseline i 10 mg/mL pepstatina A (Sigma, St. Louis, MO, USA). Nakon početnih 15h inkubacije na 37°C s 250 mL tripsina, slijedi 2h inkubacije na 65°C nakon dodavanja dodatnih 250 mL svježije pripremljene proteinaze. Po završetku inkubacije svi su uzorci kuhani još 15 minuta kako bi se potpuno uništila sva preostala enzimatska aktivnost.

Kategorija	Bodovanje
I. Površina	
Glatka/neprekinuta	3
Neregularna/prekinuta	0
II. Matriks	
Hijalin	3
Mješovito: hijalin/fibrokartilaginozni	2
Fibrokartilaginozni	1
Fibrožno tkivo	0
III. Distribucija stanica	
Kolumnarna	3
Mješovita/kolumnarni klasteri	2
Klasteri	1
Individualne stanice/dezorganizirane	0
IV. Vijabilnost stanica	
Predominiraju vijabilne stanice	3
Djelomično vijabilne stanice	1
<10% vijabilnih stanica	0
V. Suphondralna kost	
Normalna	3
Pojačano remodeliranje	2
Nekroza kosti/granulacijsko tkivo	1
Odvojena/prijelom/kalus na bazi	0
VI. Mineralizacija hrskavice	
Normalna	3
Abnormalna/na neprikladnom mjestu	0

Tablica 5. Semikvantitativna vizualna histološka metoda za procjenu novostvorenog hrskavičnog tkiva (ICRS Visual Histological Assessment Scale).¹³⁷

Tip I kolagen. Razgrađeni uzorci su analizirani inhibicijskim ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) testom, uz upotrebu antipeptidnog protutijela na kolagen tipa I dobivenog od kunića. Peptid SFLPQPPQ je sintetiziran na Kreb's Institutu, Sveučilište Sheffield, Velika Britanija, i upotrebljen je kao standard kod svih učinjenih imunoenzimskih testova.

Tip II kolagen. Razgrađeni uzorci su analizirani inhibicijskim ELISA testom uz pomoć mišjeg monoklalnog protutijela klase IgG specifičnog za denaturirani kolagen tipa II, COL2–3/4m, uz modifikaciju za korištenje na 384-rupičnoj ploči kako bi se mogli koristiti manji volumeni negoli je to potrebno za analizu na 96-rupičnoj ploči. Peptid CB11B (CGKVGPSGAP-[OH]GEDGRP[OH]GPP[OH]GPQY) je sintetiziran na Kreb's Institutu, Sveučilište Sheffield, Velika Britanija, i upotrebljen je kao standard kod svih učinjenih imunoenzimskih testova.

Glikozaminoglikani (GAG). Sadržaj glikozaminoglikana određen je kolorimetrijskom metodom vezanja dimetilmetilenskog modrila (DMMM).¹³⁹ Razgrađeni uzorci pomiješani su s otopinom DMMM-a te je na spektrofotometru očitana apsorpcija na 525 nm. Dobivene vrijednosti uspoređene su sa standardnim krivuljama. Esej je modificiran za korištenje na 384-rupičnoj ploči.

Voda. Postotak vode je određen oduzimanjem suhe težine od ukupne težine uzorka, te dijeljenjem tog broja s mokrom težinom uzorka.

3.6. Biomehanička analiza hrskavice

Biomehanička svojstva novostvorenog tkiva analizirana su indentacijskim mikroskopom atomskih sila (IT AFM od engl. indentation-type atomic force microscopy). Analizirani cilindri promjera 2 mm dobiveni su iglom za biopsiju kože, a osobita je pažnja

posvećena kako bi se iz uzorka isključila suphondralna kost. Nakon prikupljanja uzorci su pohranjeni na 4°C u PBS otopini kojoj je dodan koktel inhibitora proteaza.

Priprema preparata za analizu, dobivanje podataka i analiza podataka učinjena je po protokolu koji su opisali Stolz i suradnici.¹⁴⁰ Biomehaničke osobine hrskavice, odnosno čvrstoća je određena mjerenjem dinamičkog elastičnog modulusa $|E^*|$ na dva nivoa organizacije tkiva – mikrometarskom ($|E^*|_{\text{micro}}$) i nanometarskom ($|E^*|_{\text{nano}}$). Sferični vrh s radijusom promjera 7.5 μm (SPI Supplies, West Chester, PA, SAD) postavljen je na završetak četvrtaste konzole napravljene od silikona s nominalnom konstantom opruge 6.8 N/m, i korišten je za mjerenja na mikrometarskoj skali. Za mjerenja na nanometarskoj skali korišten je piramidalni vrh nominalnog radijusa od 20 nm postavljenog na 200 mm dugačku konzolu V oblika s nominalnom konstantom opruge od 0.06 N/m (Veeco, Santa Barbara, CA, SAD). Analiza AFM-om je vršena u tzv. sila-volumen načinu rada, a krivulje odnosa opterećenja i pomaka (engl. load-displacement curve) su bilježene na pet različitih mjesta na uzorku pri frekvenciji od 3 Hz. Podaci zabilježeni na svakom pojedinom mjestu uzorka sastoje se od 256 krivulja odnosa opterećenja i pomaka (svaka se krivulja sastoji od 512 točaka), a upotrebljene su za izračunavanje dinamičkog elastičnog modulusa.

3.7. Analiza sinovijalne ovojnice metodom PCR

Kako bi se utvrdila prisutnost adenoviralnog genoma u stanicama sinovijalne ovojnice zglobova, proveli smo analizu metodom reakcije lančane polimeraze (PCR, od eng. Polymerase Chain Reaction). Uzorci sinovijalne ovojnice su analizirani 180 dana nakon kirurškog zahvata. Uzorci tkiva su razgrađeni uz pomoć proteaze K tijekom 4 sata na 37 °C. Ukupna DNA je ekstrahirana uz pomoć DNeasy Tissue kita (Qiagen, Valencia, CA, SAD), i to prema uputama proizvođača. Amplifikacija sekvence citomegalovirusnog

promotora i ovčjeg β -aktin gena obavljena je uz pomoć slijedećih početnica: citomegalovirus forward 5'-TCATATGCCAAGTACGCCCCC-3', citomegalovirus reverse 5'-TGGGGCGGAGTTGTTACGAC-3'; β -aktin forward 5'-CATGCCATCCTGCGTCTGGACC-3', β -aktin reverse 5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3'. Proizvodi amplifikacije su vizualizirani na agaroznom gelu s etidij bromidom.

3.8. Statistička analiza

Prije same obrade podataka Kolmogorov-Smirnovljevim testom provjerili smo normalnost raspodjela podataka za ispitivane varijable. U slučaju biokemijskih varijabli za sadržaj GAG-a, kolagena I, kolagena II i vode, te u slučaju dinamičkog modulusa elastičnosti $|E^*|_{\text{micro}}$ raspodjela se nije statistički značajno razlikovala od normalne što nam je omogućilo korištenje parametrijskih postupaka u daljnjoj obradi. Raspodjela varijabli za dinamički elastični modulus $|E^*|_{\text{nano}}$ statistički značajno se razlikovala od normalne, te smo kod njega primjenili neparametrijske postupke.

Biokemijske i biomehaničke osobine hrskavičnog reparata su izražene kao aritmetička sredina i standardna devijacija ($M \pm SD$). Obzirom da je nativna hrskavica kontralateralnog koljena životinje služila kao kontrola, u analizi ovih podataka korišten je t-test za zavisne uzorke kako bi se usporedila nativna i tretirana hrskavica posebno za svaku skupinu. Potom je primjenjena analiza varijance (ANOVA) kako bi se usporedile tretirane skupine međusobno, kao i Tukeyev post-hoc test gdje je to bilo potrebno.

Biomehanička svojstva hrskavice na nanometarskom nivou organizacije tkiva, kao i podaci dobiveni histološkom analizom prikazani su medijanom i interkvartilnim rasponom ($C \pm Q$). U analizi navedenih varijabli primjenjen je neparametrijski ekvivalent t-testa za zavisne uzorke (Wilcoxonov test ekvivalentnih parova). Potom smo Kruskal-Wallisovim

testom usporedili vrijednosti histoloških parametara i dinamičkog modula elastičnosti $|E^*|_{\text{nano}}$ između četiri skupine. Kad je test pokazao postojanje statistički značajnu razliku, Mann-Whitneyevim testom ispitali smo razlike među parovima skupina. Zbog višestrukih usporedbi (četiri skupine, svaka sa svakom, što iznosi ukupno šest usporedbi) koristili smo Bonferronijevu korekciju, te je granica statističke značajnosti u tim testovima snižena na 0.008 za histološke parametre i 0.017 za dinamički elastični modulus $|E^*|_{\text{nano}}$.

U analizi povezanosti biokemijskih i biomehaničkih parametara korišten je Spearmanov korelacijski test.

Prilikom svih usporedbi razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0.05$.

4. REZULTATI

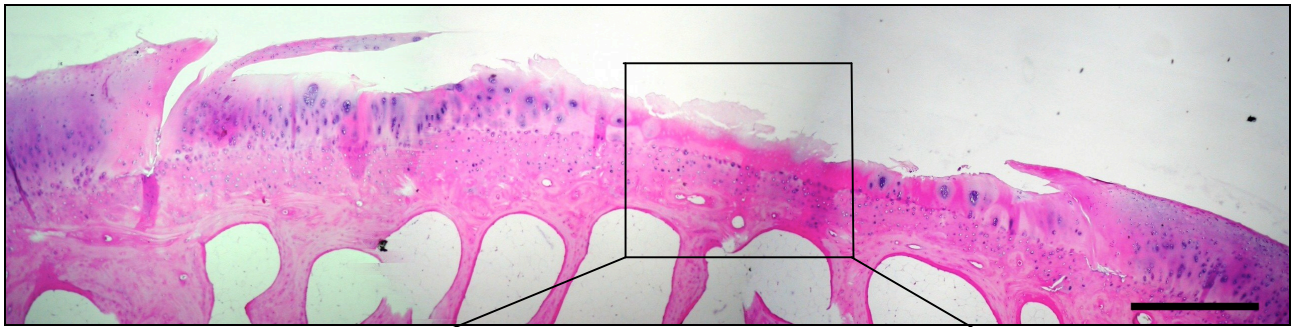
4.1. Mikroskopska procjena cijeljenja hrskavice

Histološka analiza preparata pokazala je kako je u svim tretiranim skupinama došlo do stvaranja reparata hrskavice, osim u kontrolnoj skupini gdje je ostalo prazno oštećenje (slike 16. – 23.). To je razvidno i iz rezultata ukupnog ICRS skora koji za CON skupinu iznosi 6.5 dok za grupe tretirane transplantacijom ugruška autologne koštane moždine iznosi oko 11 (rezultati su pregledno prikazani u tablici 6.). Statistički značajna razlika je uvrđena za ocjenski kriterij distribucije stanica i to za TGF skupinu u odnosu na CON skupinu, što je u skladu s opaženom kolumnarnom distribucijom hondrocita u TGF skupini. Primijećeni artefakti u smislu centralne nekroze i nedostatka reparata u dijelovima oštećenja posljedica su ranog postoperacijskog opterećenja zgloba, odnosno velikih sila kompresije i smika koje su djelovale na sam transplantat. Također valja napomenuti kako integracija transplantata u zdravo tkivo nije idealna. Ipak, analiza dobivenih rezova pokazala je kako je ispunjenost oštećenja u slučaju CON, GFP i TGF skupina podjednaka, s tim što je jedino u skupini TGF primijećena kolumnarna distribucija hondrocita, kao i jednomjernija distribucija GAG-a, što je osobito uočljivo na rezovima bojanim safraninom-O (slike 22. i 23.). Osobito je dobro uočljiva jasna granica između fibrokartilaginoznog reparata i zdrave hijaline hrskavice na preparatima iz grupe BMC (slike 18. i 19.). Također valja napomenuti kako je na svim analiziranim preparatima očuvan integritet suphondralne kosti, što znači da je reпарат nastao isključivo kao posljedica transplantiranja ugruška, odnosno da nije bilo ulaska progenitornih stanica iz koštane moždine.

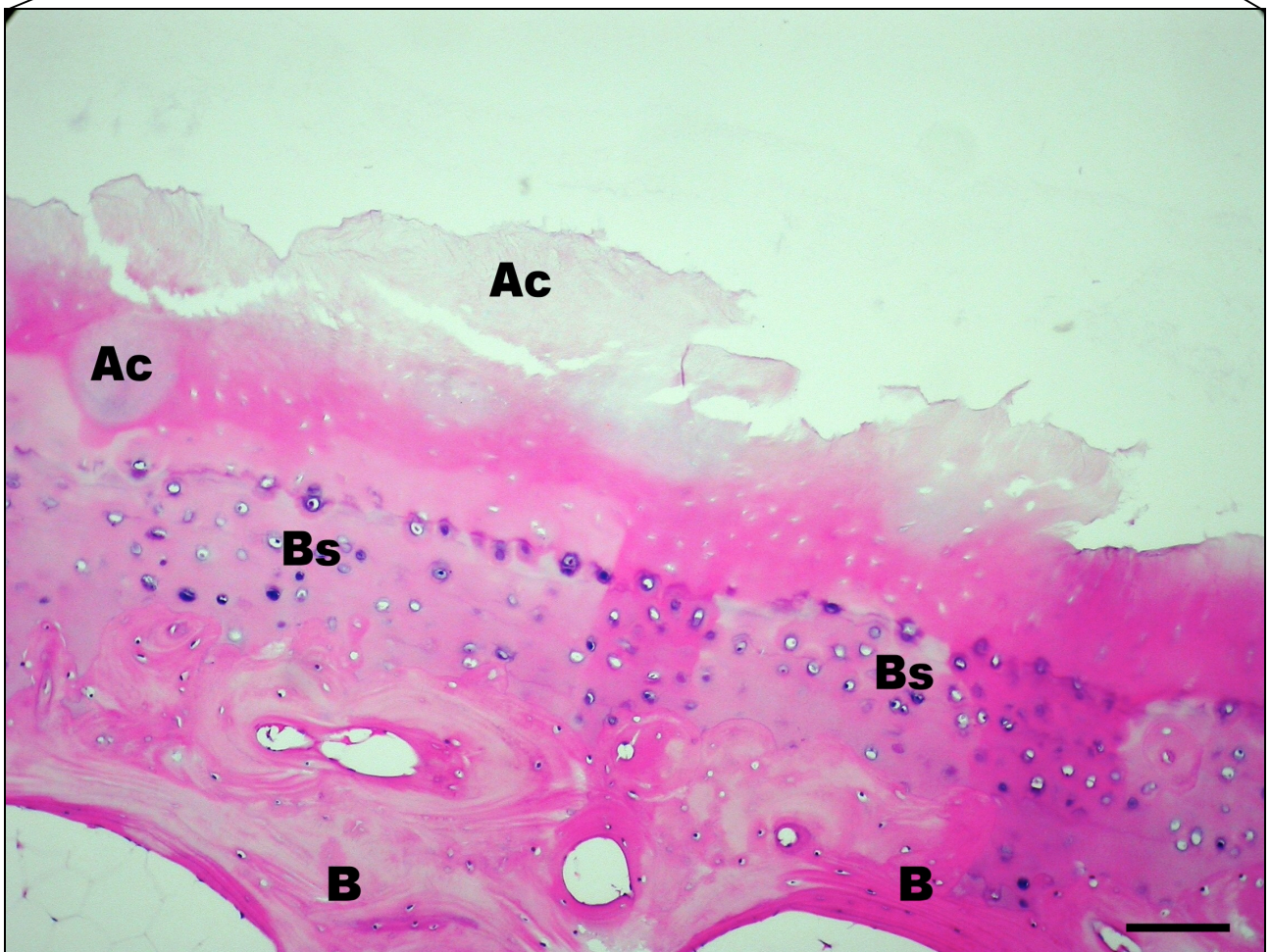
ICRS Skor	Ispitivane skupine							
	CON		BMC		GFP		TGF	
	C	Q	C	Q	C	Q	C	Q
Površina	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0
Matriks	1.50	2	3.00	1	3.00	2	3.00	0
Distribucija stanica	1.00	0	2.00	0	2.00	2	2.00*	0
Vijabilnost staničnih populacija	0.00	1	1.00	3	0.00	0	0.00	0
Suphondralna kost	2.50	1	3.00	0	3.00	3	3.00	0
Mineralizacija hrskavice	1.50	3	3.00	0	3.00	3	3.00	0
Srednji ukupni skor	6.50	6	11.50	4	11.00	9	11.00	0

Tablica 6. Rezultati nakon analize i ocjene histoloških preparata semikvantitativnom ocjenskom ljestvicom po ICRS-u prikazani su medijanom i interkvartilnim rasponom ($C \pm Q$), i to kako s obzirom na testirane skupine eksperimentalnih životinja (tretirane skupine B, C i D, i kontrolne skupine A) tako i s obzirom na promatrane ocjenske kriterije.

* statistički značajne razlike u odnosu na skupinu A (Kruskal-Wallisov test)

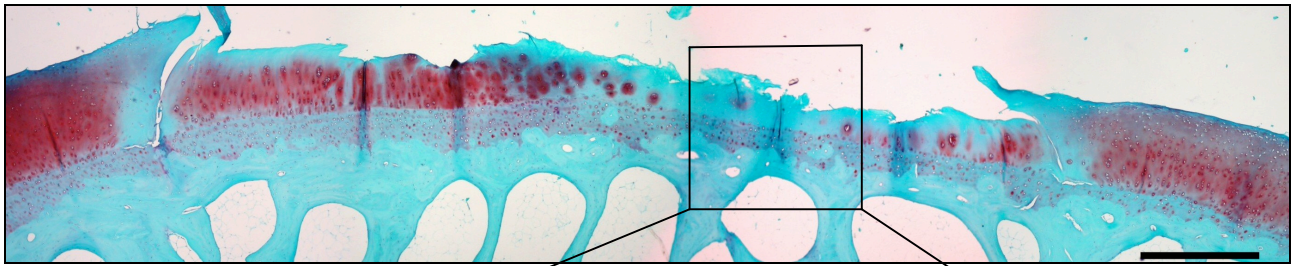


A

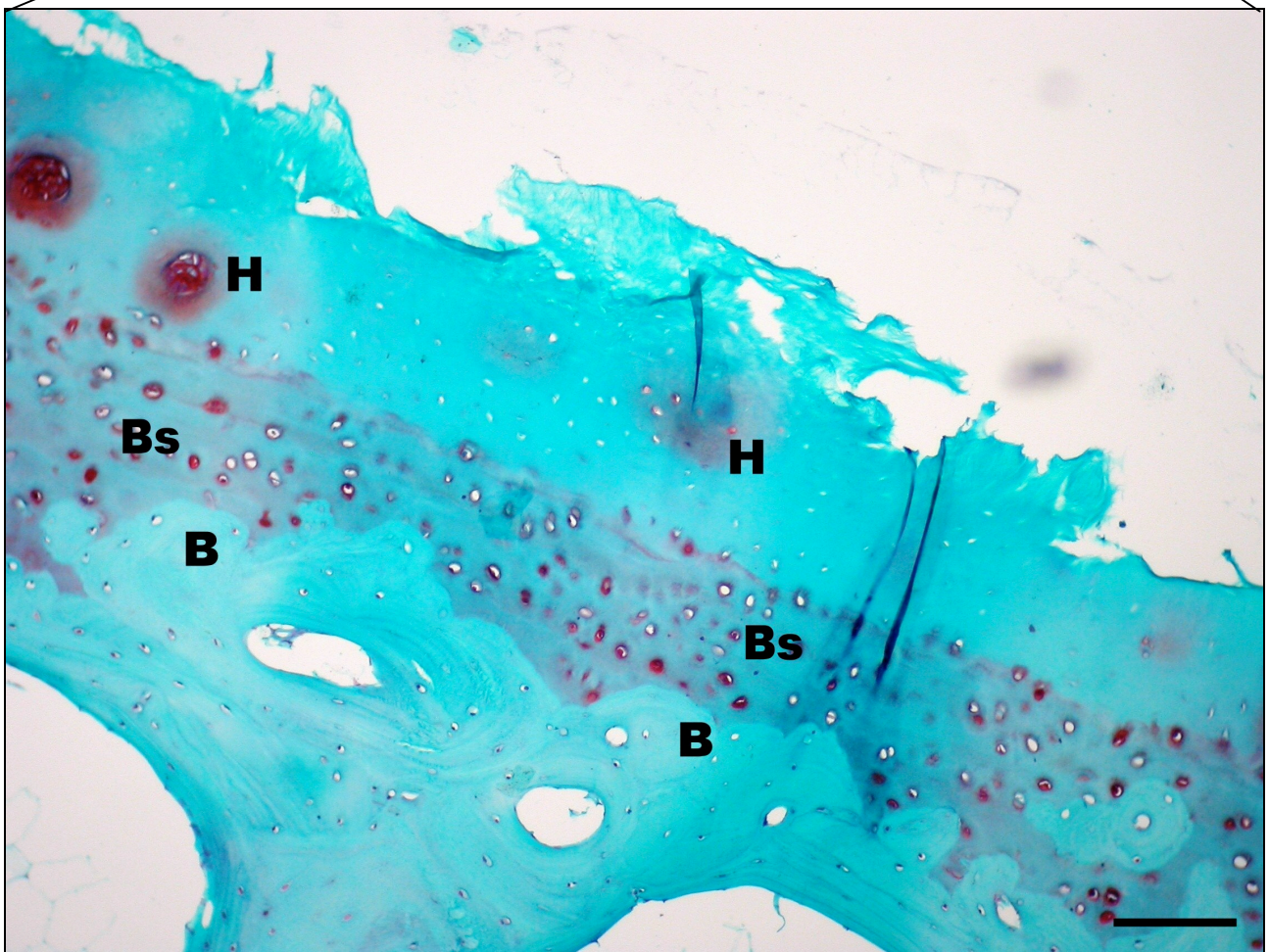


B

Slika 16. Prikaz hrskavičnog oštećenja iz skupine CON (prazno oštećenje) pokazuje odsutstvo reparata uz acelarne komadiće tkiva (Ac). Suphondralna (Bs) i trabekularna kost (B) su intaktne. Preparat je bojan hemalaun-eozinom uz povećanje A) x40 (horizontalna linija označava 1 mm) i B) x100 (horizontalna linija označava 100 μ m)

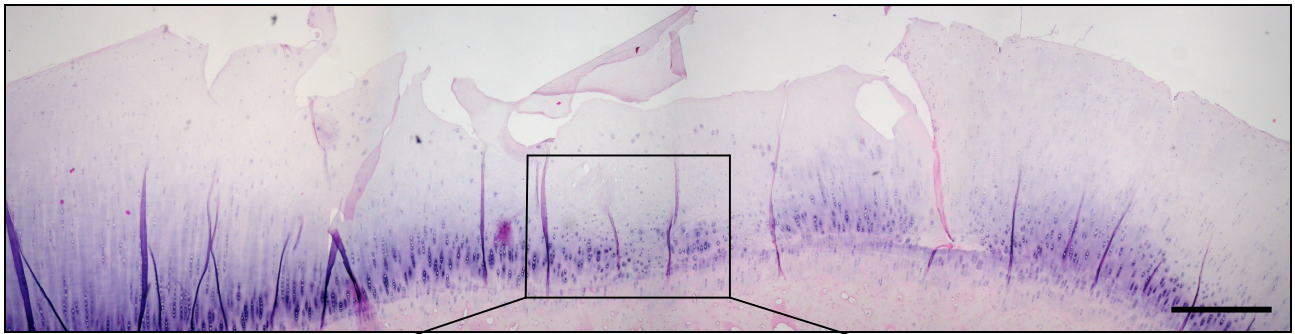


A

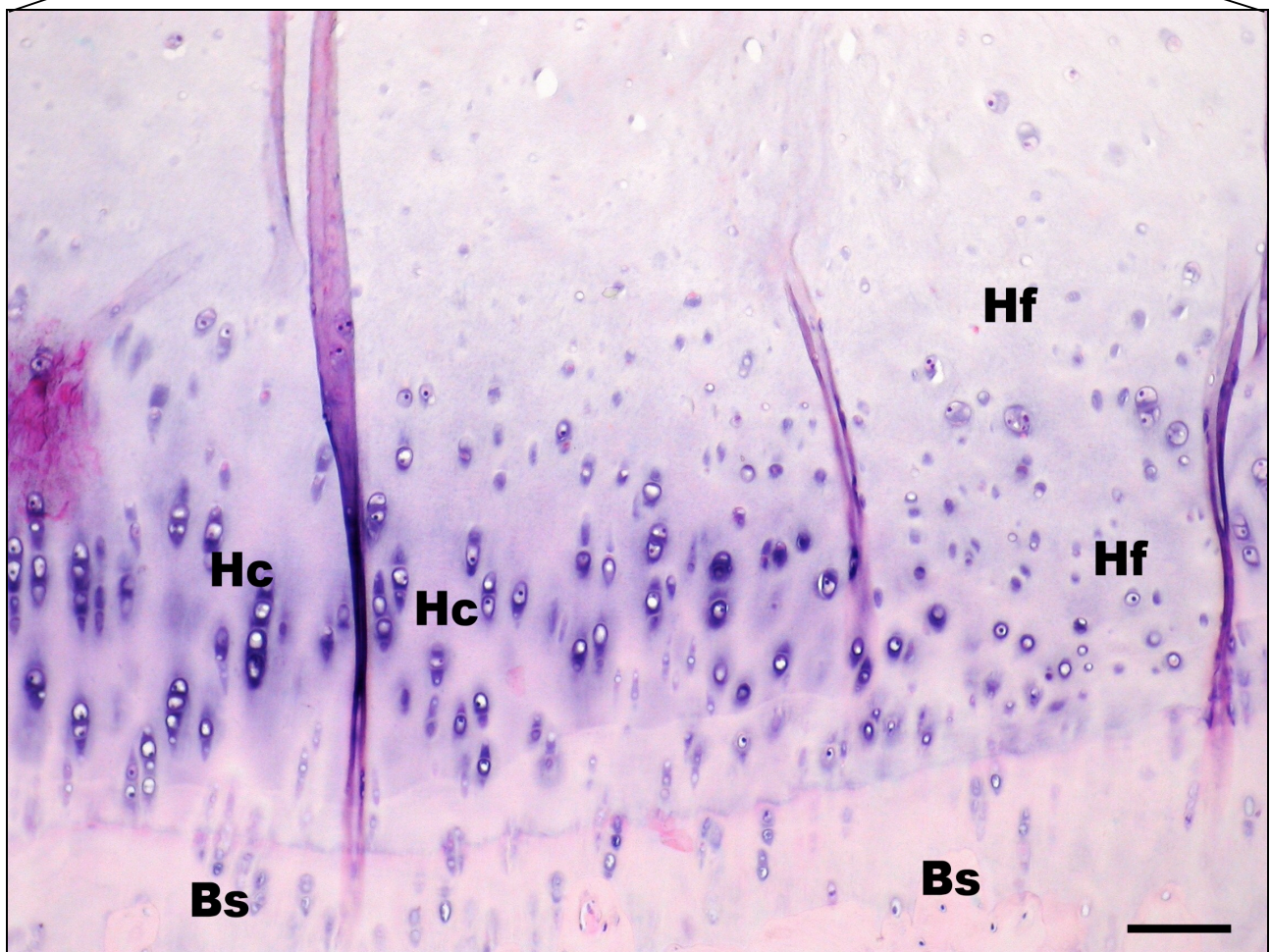


B

Slika 17. Isti preparat sa slike 16. bojan safraninom-O. Potpuno odsustvo glikozaminoglikana u acelularnom matriksu, uz diskretne otočiće hijaline hrskavice (H). A) x40 (horizontalna linija označava 1 mm) i B) x100 (horizontalna linija označava 100 μ m). Bs (suphondralna kost), B (trabekularna kost).

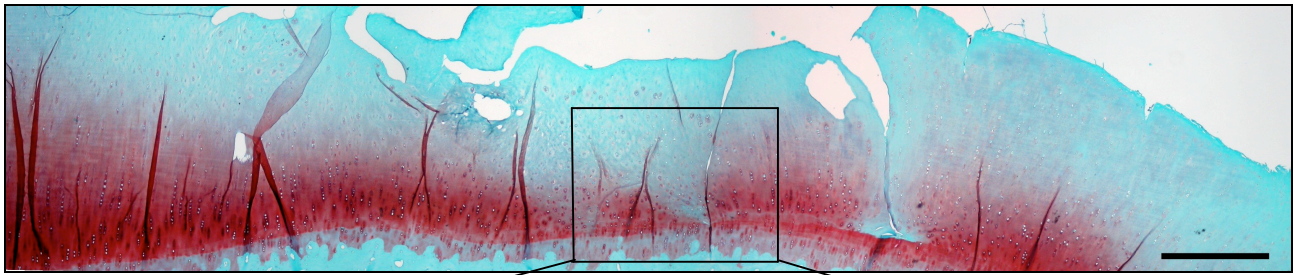


A

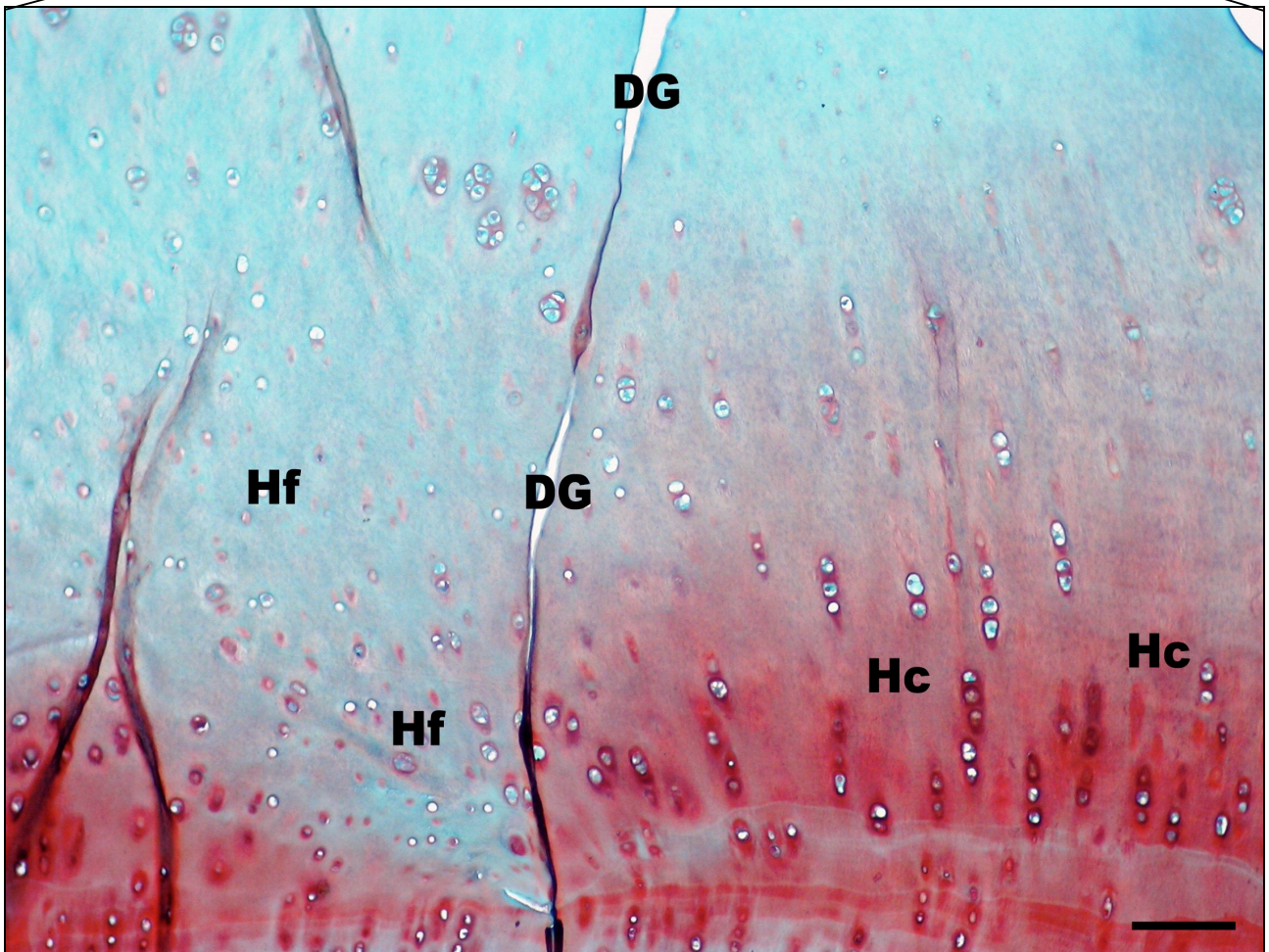


B

Slika 18. Prikaz hrskavičnog oštećenja iz skupine BMC (transplantiran samo ugrušak koštane moždine) pokazuje prisutstvo hijalinih (Hc) i fibrokartilaginoznih elemenata u reparatu (Hf). Osobito je dobro uočljiva razlika u kolumnarnoj organizaciji hondrocita u dubokom sloju hijaline hrksavice. Bs (suphondralna kost). Preparat je bojan hemalaun-eozinom uz povećanje A) x40 (horizontalna linija označava 1 mm) i B) x100 (horizontalna linija označava 100 μ m).

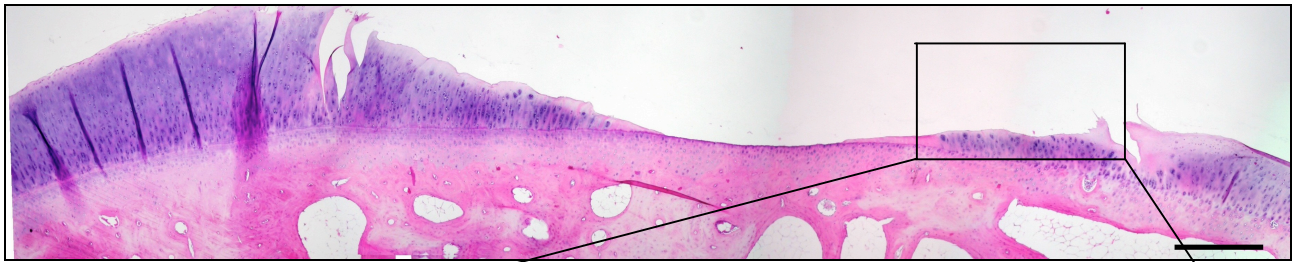


A

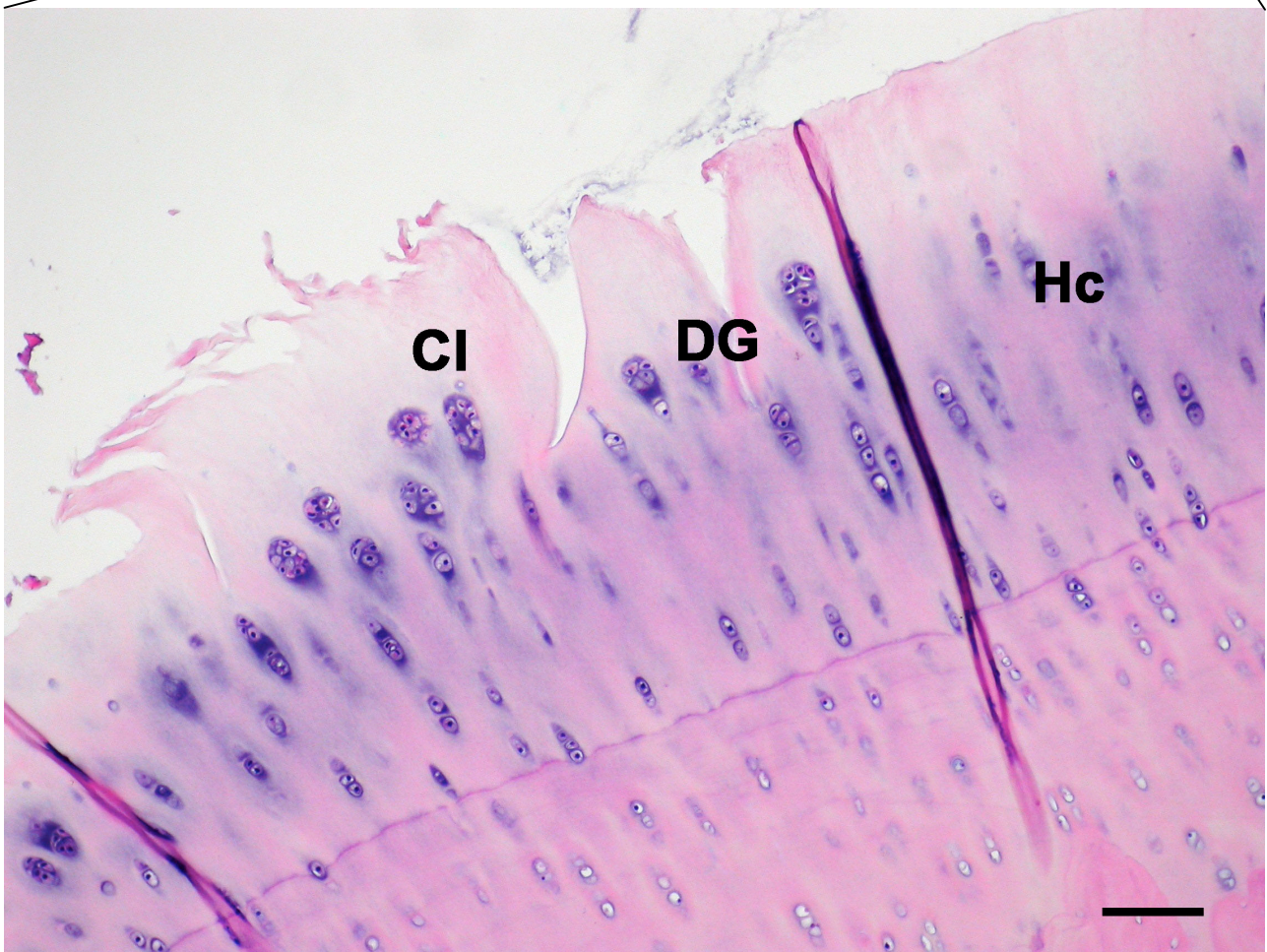


B

Slika 19. Isti preparat sa slike 18. bojan safraninom-O. Granica između reparata i native hrskavice (DG) pokazuje fibrokartilaginozni reparat u oštećenju (Hf) i hijalinu hrskavicu (Hc) u dijelu koji odgovara nativnoj hrskavici. Uočljivo je veća količina GAG-a u nativnoj hrskavici. A) x40 (horizontalna linija označava 1 mm) i B) x100 (horizontalna linija označava 100 μ m).

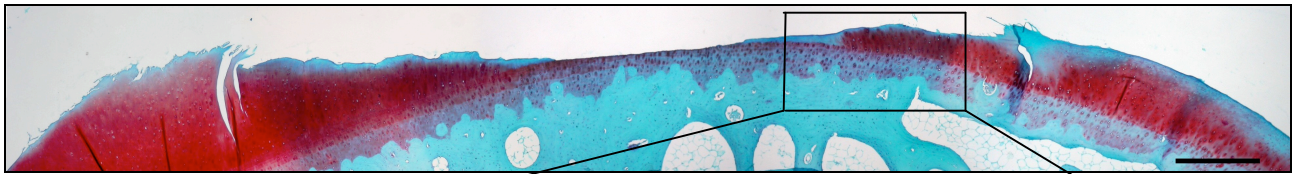


A

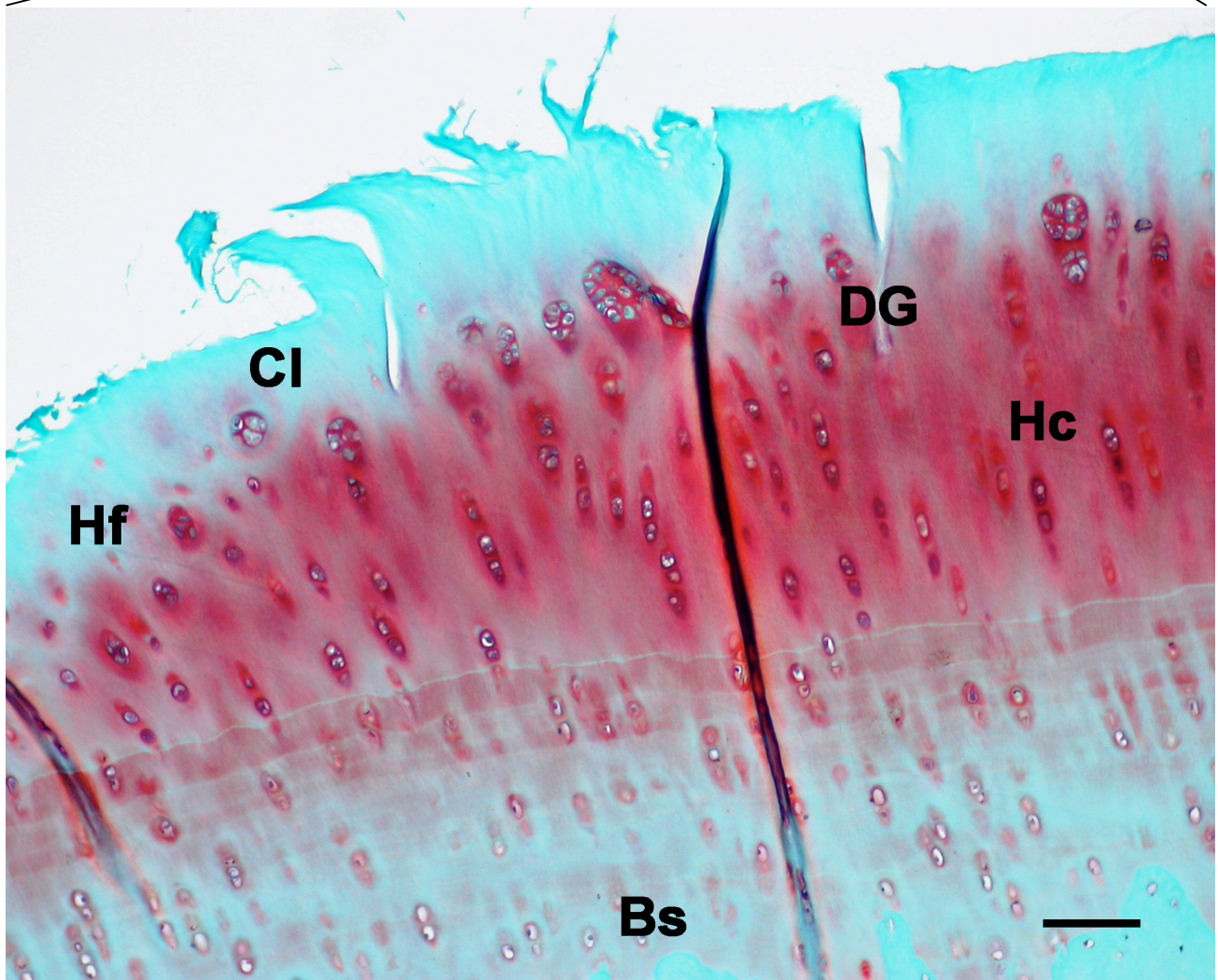


B

Slika 20. Prikaz hrskavičnog oštećenja iz skupine GFP (transplantiran ugrušak koštane moždine transduciran s Ad.GFP) pokazuje prisutstvo klastera hondrocita (CL), te fisure na površini. DG (rub oštećenja), Hc (hijalina hrskavica), Bs (suphondralna kost). Preparat je bojan hemalaun-eozinom uz povećanje A) x40 (horizontalna linija označava 1 mm) i B) x100 (horizontalna linija označava 100 μ m).

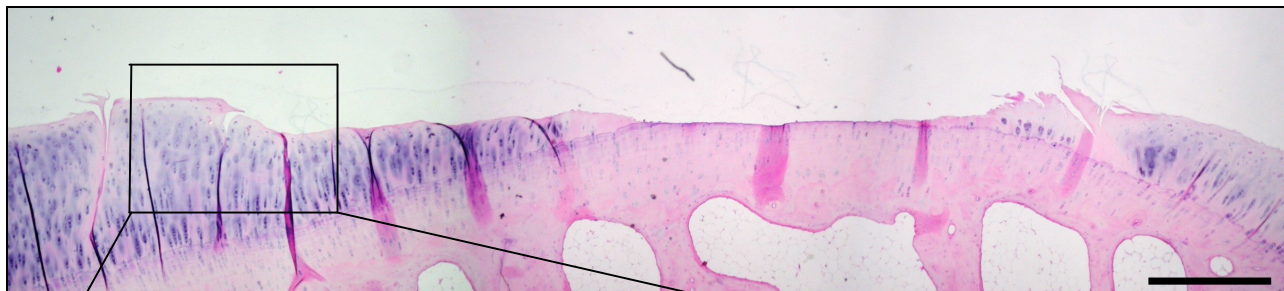


A

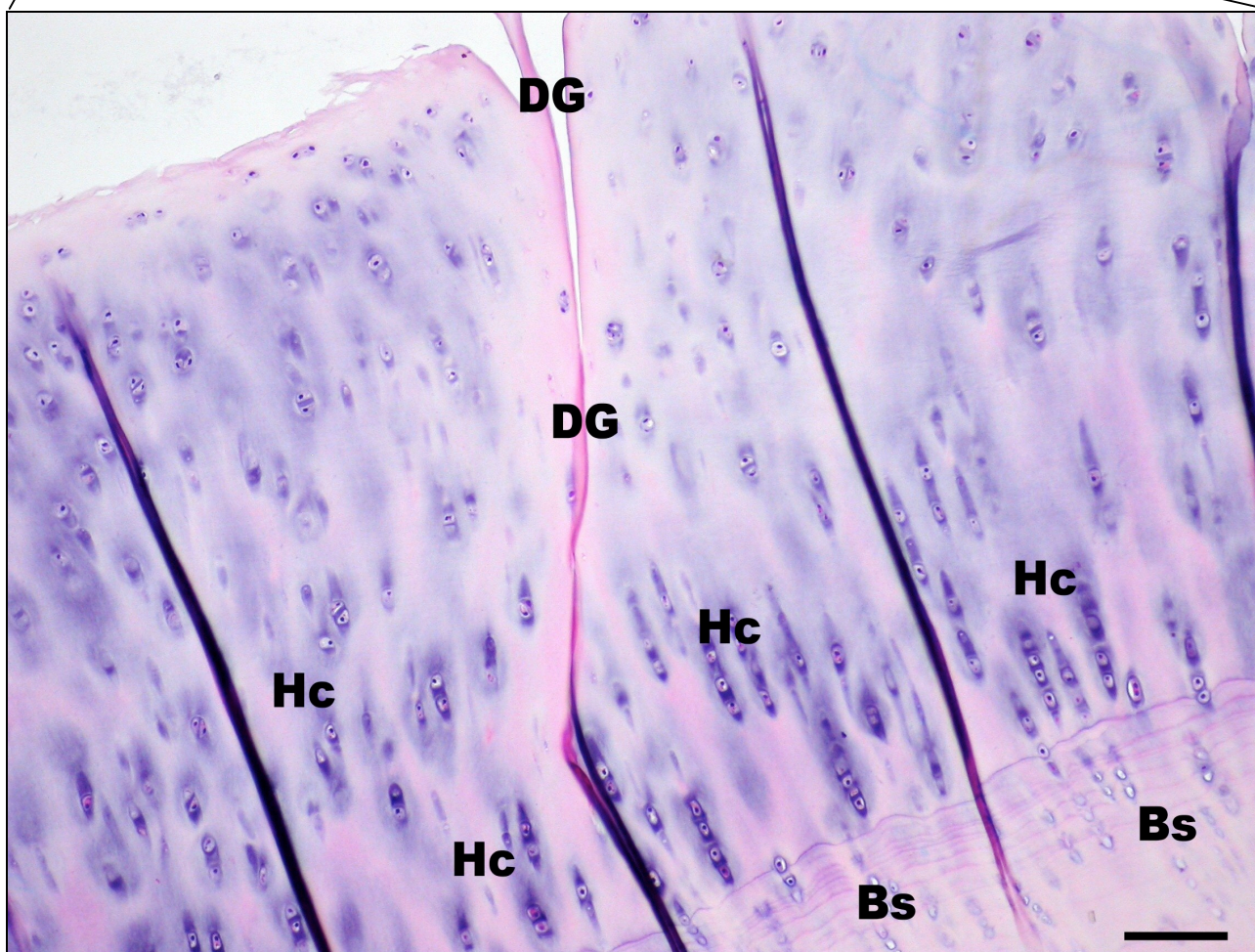


B

Slika 21. Isti preparat sa slike 20. bojan safraninom-O. CI (klasteri hondrocita), DG (rub oštećenja), Bs (suphondralna kost), Hf (fibrokartilaginozni reparat). A) x40 (horizontalna linija označava 1 mm) i B) x100 (horizontalna linija označava 100 μ m).

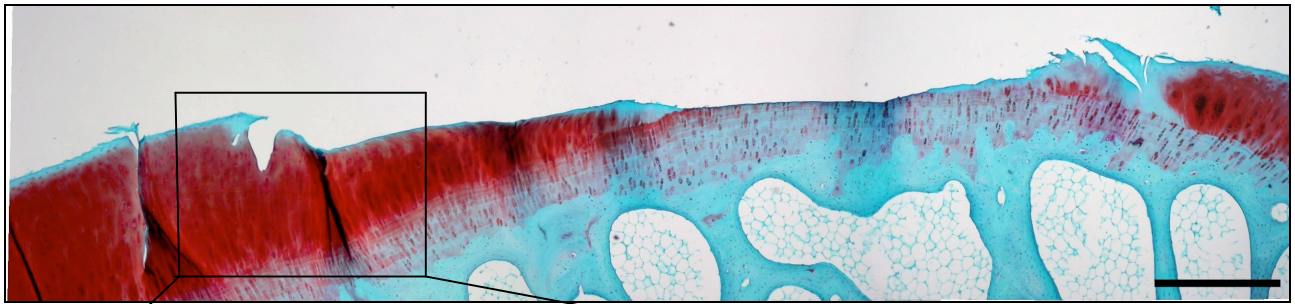


A

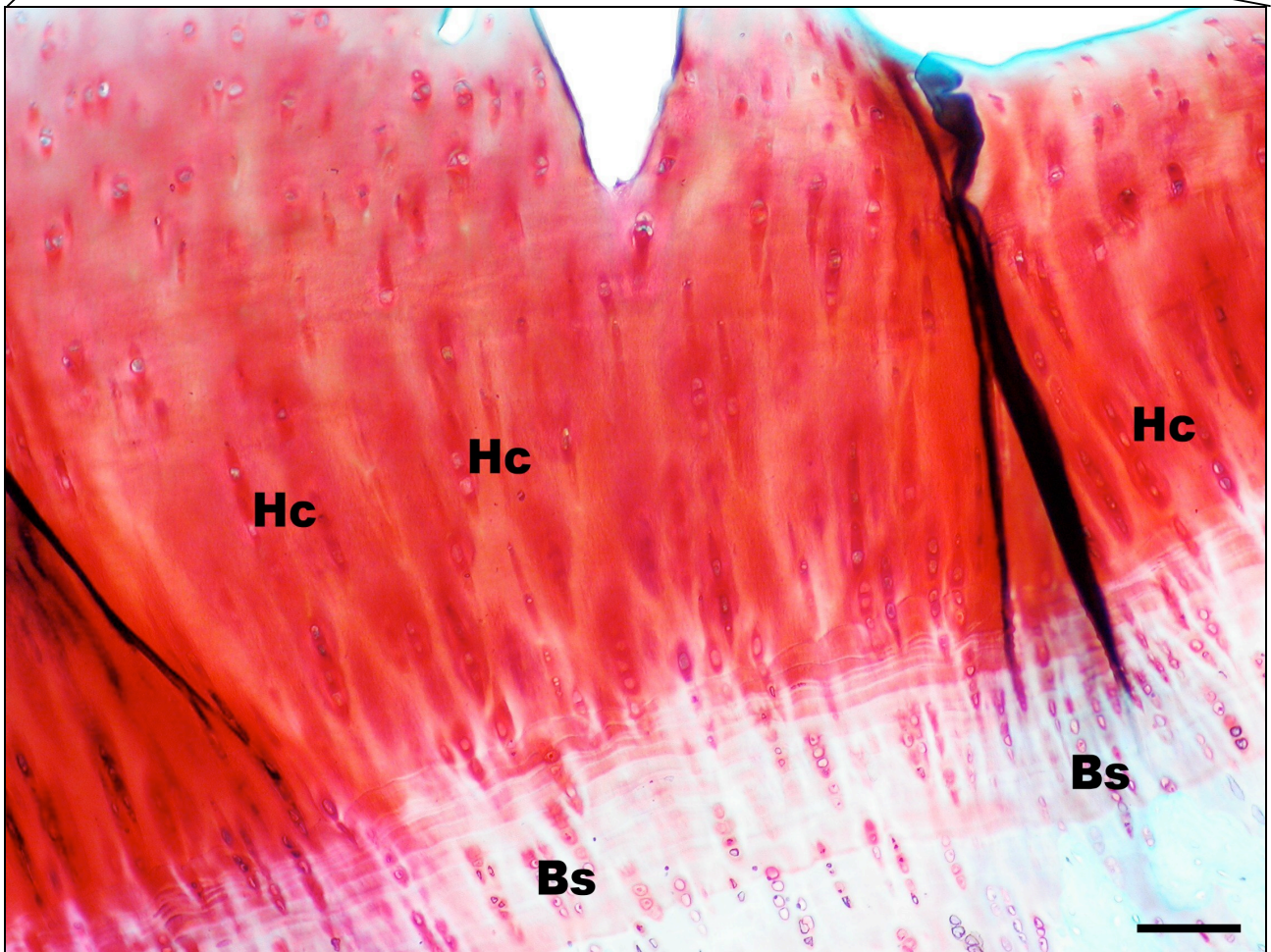


B

Slika 22. Prikaz hrskavičnog oštećenja iz skupine TGF (transplantiran ugrušak koštane moždine transduciran s Ad.TGF) pokazuje prisutstvo hijaline hrksavice (Hc) s obje strane oštećenja uz kolumnarnu organizaciju hondrocita u dubokom sloju. Postranična integracija novostvorenog tkiva nije idealna, i granica oštećenja je dobro vidljiva (DG). Bs (suphondralna kost). Preparat je bojan hemalaun-eozinom uz povećanje A) x40 (horizontalna linija označava 1 mm) i B) x100 (horizontalna linija označava 100 μ m).



A

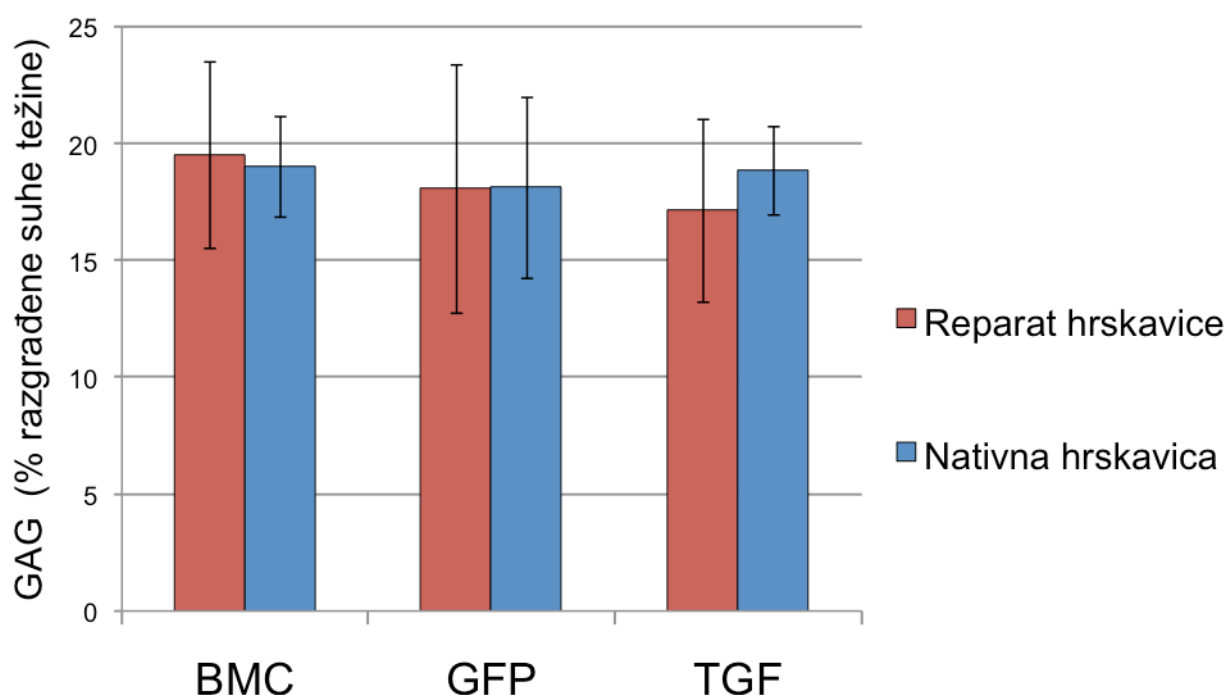


B

Slika 23. Isti preparat sa slike 22. bojan safraninom-O. Granica između reparata i native hrskavice je prisutna, no s obje strane se nalazi hijalina hrskavica (Hc). Također je prisutna ravnomjerna distribucija GAG-a. A) x40 (horizontalna linija označava 1 mm) i B) x100 (horizontalna linija označava 100 μ m).

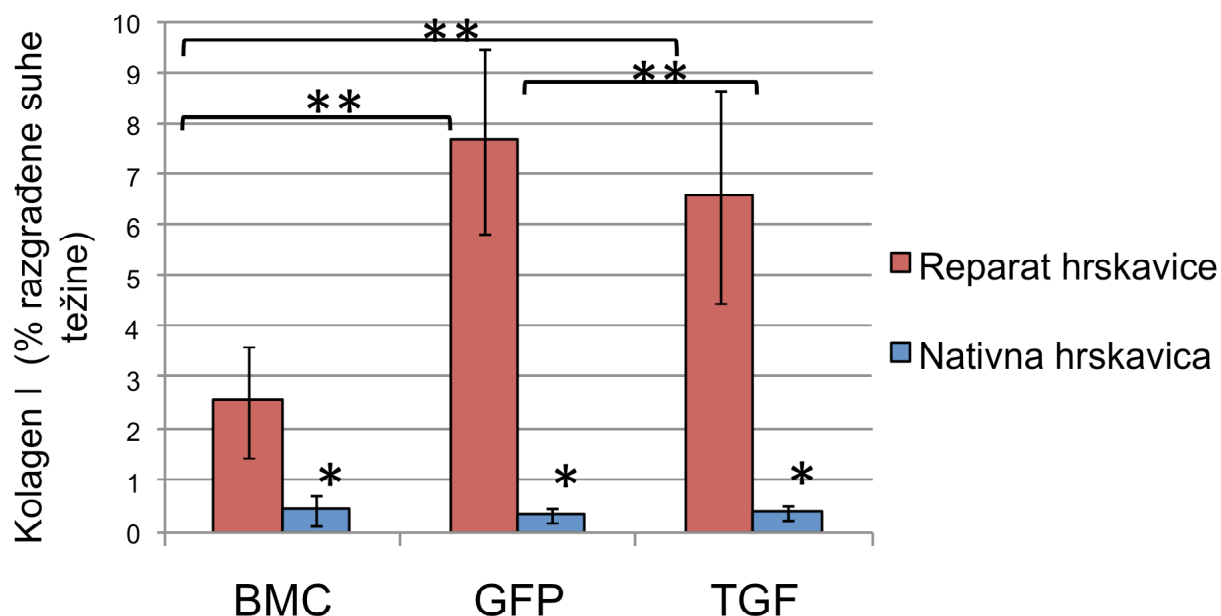
4.2. Biokemijski parametri cijeljenja hrskavice

GAG analiza nije pokazala statistički značajnu razliku srednjih vrijednosti za ispitivane skupine u odnosu na nativnu hrskavicu iz kontralateralnog koljena, a također niti analiza varijance nije pokazala razlike između samih tretiranih skupina (BMC, GFP i TGF) ($F_{2,19}=0.6$, $p=0.581$) (Slika 24.).



Slika 24. Usporedba udjela glikozaminoglikana (GAG) u hrskavičnom reparatu i nativnoj hrskavici kontralateralnog koljena ne pokazuje statistički značajnu razliku (analiza varijance; $F_{2,19}=0.6$, $p=0.581$). Udio je izražen kao postotak razgrađene suhe težine.

Udio kolagena I statistički značajno je veći kod svih tretiranih skupina u odnosu na nativnu hrskavicu, a analiza varijance je pokazala da postoje razlike i između tretiranih skupina ($F_{2,19}=13.9$, $p<0.001$) (Slika 25.). Tukeyeva post-hoc analiza otkriva da je udio kolagena I u skupini BMC značajno niži od onoga u skupinama GFP i TGF ($p<0.001$ and $p=0.001$), dok razlike nisu nađene kod usporedbe skupina GFP i TGF ($p=0.482$).

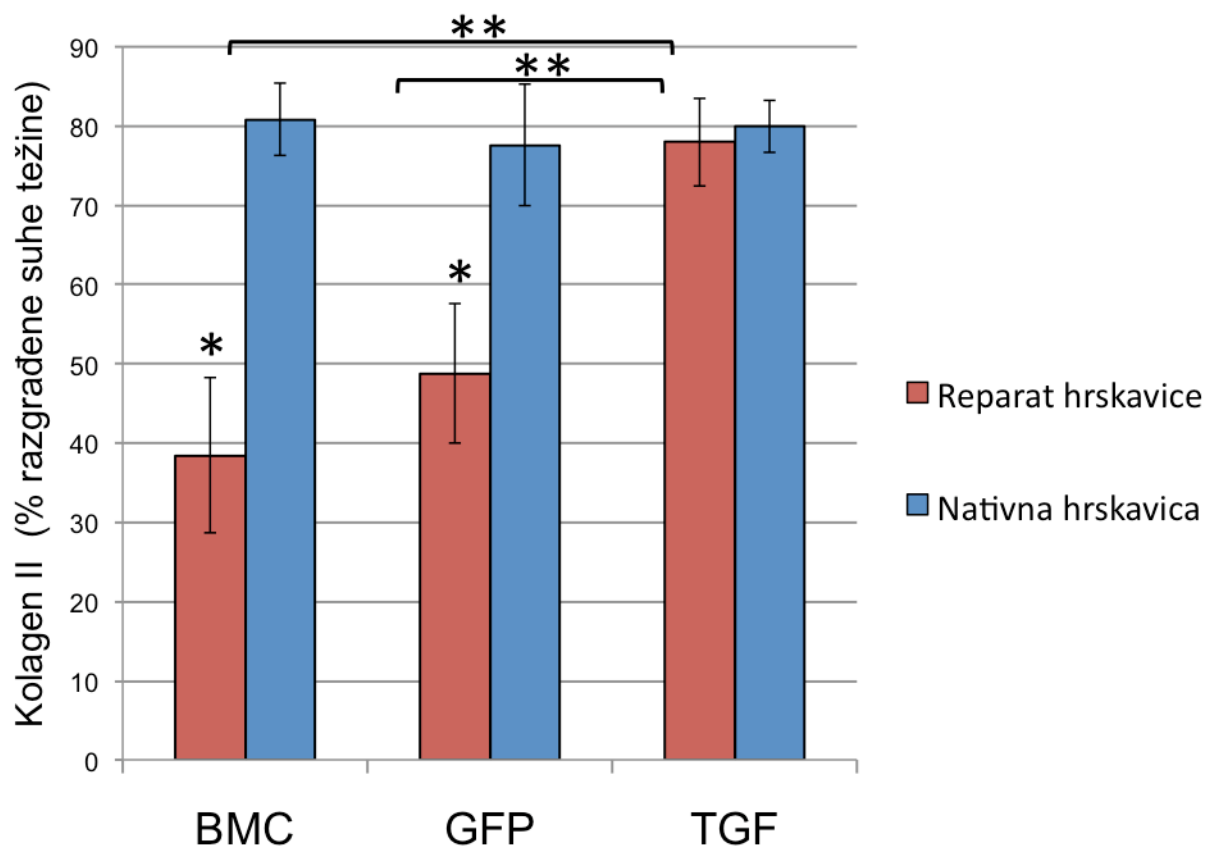


Slika 25. Usporedba udjela kolagena tipa I u hrskavičnom reparatu i nativnoj hrskavici kontralateralnog koljena pokazuje statistički značajnu razliku svih ispitivanih skupina u odnosu na nativnu hrskavicu. Udio je izražen kao postotak razgrađene suhe težine. Analiza varijance pokazuje razlike između ispitivanih skupina ($F_{2,19}=13.9$, $p<0.001$).

* t-test za zavisne uzorke ($p<0.05$)

** analiza varijance s Tukeyevim post-hoc testom ($p<0.05$)

Udio kolagena II u hrskavičnom reparatu značajno je manji u skupinama BMC ($p<0.001$) i GFP ($p<0.001$), no razlika nije utvrđena za skupinu TGF u odnosu na nativnu hrskavicu ($p=0.370$). Analiza varijance pokazala je značajnu razliku između tretiranih skupina ($F_{2,19}=56.2$, $p<0.001$) (Slika 26.). Tukeyeva post-hoc analiza otkriva da je udio kolagenskih vlakana tipa II značajno veći kod reparata iz skupine TGF u odnosu na BMC i GFP skupine (obje vrijednosti $p<0.001$), dok razlika nije nađena usporedbom GFP i BMC skupina ($p=0.079$).



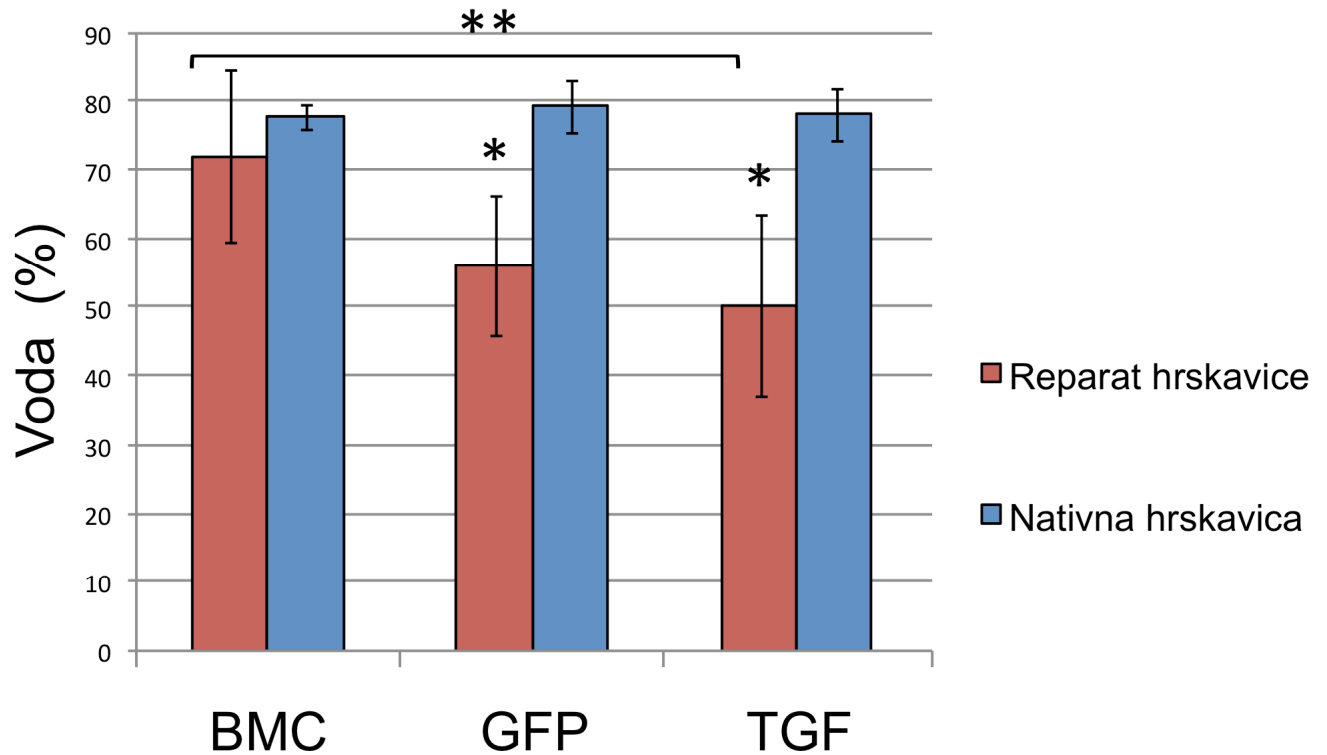
Slika 26. Usporedba udjela kolagena tipa II u hrskavičnom reparatu i nativnoj hrskavici kontralateralnog koljena pokazuje statistički značajnu razliku za skupine BMC i GFP (u oba slučaja $p < 0,001$), dok razlika nije utvrđena usporedbom TGF i nativne hrskavice ($p = 0,370$). Analiza varijance pokazala je razliku između tretiranih skupina ($F_{2,19} = 13,9$, $p < 0,001$). Udio je izražen kao postotak razgrađene suhe težine.

* t-test za zavisne uzorke ($p < 0,05$)

** analiza varijance s Tukeyevim post-hoc testom ($p < 0,05$)

Udio vode značajno je niži u skupinama TGF ($p < 0,001$) i GFP ($p = 0,005$), dok razlika nije nađena u skupini BMC u odnosu na nativnu hrskavicu ($p = 0,297$). Analiza varijance pokazala je da postoje razlike između tretiranih skupina ($F_{2,19} = 5,9$, $p = 0,01$) (Slika 27.). Tukeyev post-hoc test otkriva kako je udio vode u TGF skupini značajno niži u

odnosu na BMC skupinu ($p=0.008$), dok razlike nisu nađene usporedbom GFP i TGF skupina ($p=0.635$), te GFP i BMC skupina ($p=0.089$).



Slika 27. Usporedba udjela vode u hrskavičnom reparatu i nativnoj hrskavici kontralateralnog koljena pokazuje statistički značajnu razliku za skupine TGF ($p<0.001$) i GFP ($p=0.005$), dok razlika nije utvrđena usporedbom BMC i nativne hrskavice ($p=0.297$). Analiza varijance pokazala je razliku između tretiranih skupina ($F_{2,19}=5.9$, $p=0.01$). Udio je izražen kao postotak ukupne težine.

* t-test za zavisne uzorke ($p<0.05$)

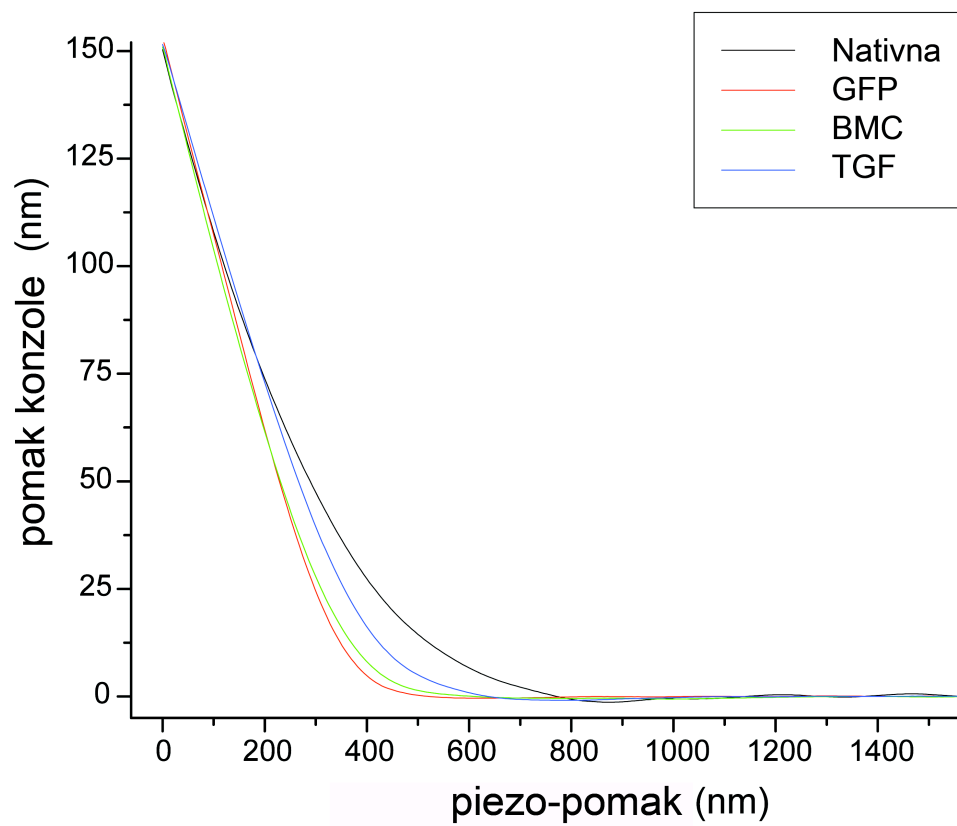
** analiza varijance s Tukeyevim post-hoc testom ($p<0.05$)

4.3. Dinamički modul elastičnosti

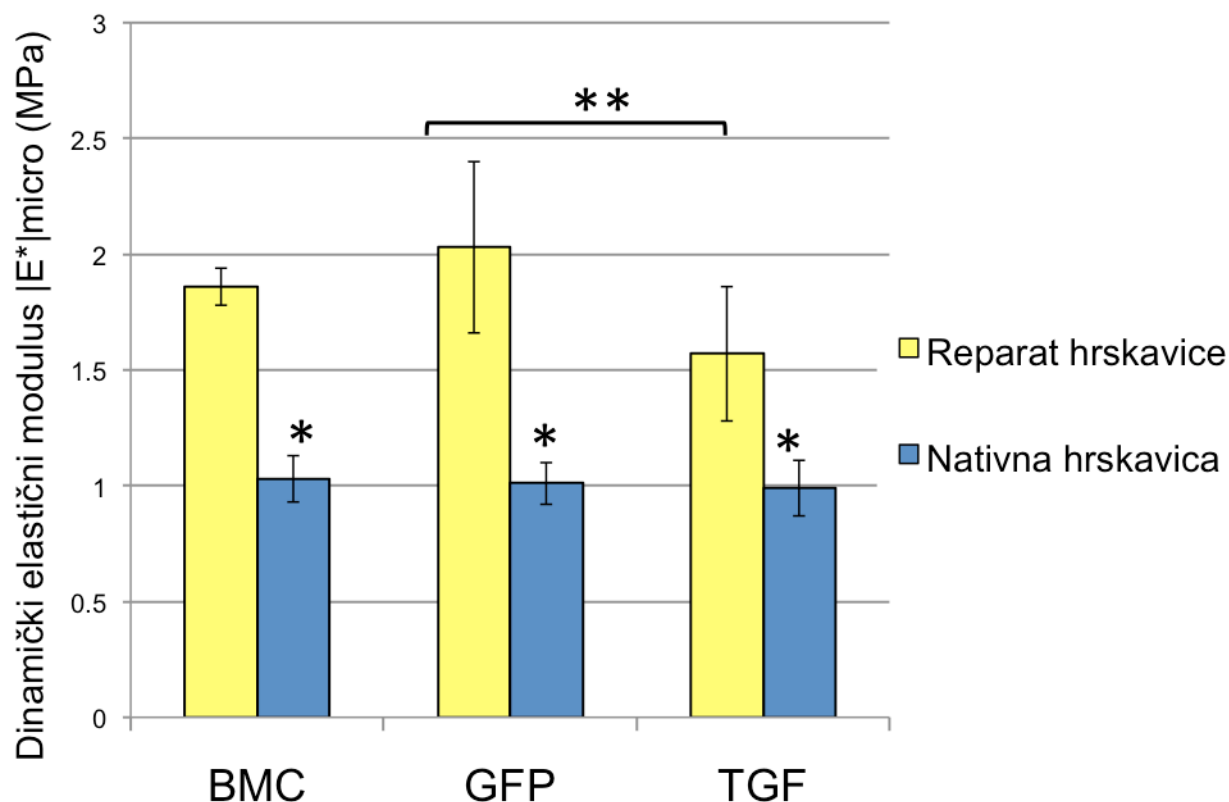
4.3.1. Čvrstoća hrskavice na mikrometarskom nivou

Krivulje odnosa opterećenja i pomaka za nativnu i repariranu hrskavicu prikazane su na slici 28. Sva su mjerenja rađena s mikrosferičnom sondom čiji nominalni radijus iznosi 7.5 μm , što znači da ovi rezultati odražavaju strukturalne promjene hrskavice na mikrometarskom nivou organizacije tkiva. Dobivene krivulje ne razlikuju se po svom obliku, no dobivene vrijednosti dinamičkog elastičnog modulusa $|E^*|_{\text{micro}}$ postepeno se povećavaju od nativne hrskavice, preko TGF i BMC skupine do GFP skupine kod koje su izmjerene najveće vrijednosti. Vrijednosti $|E^*|_{\text{micro}}$ za tretirane skupine statistički su veće u odnosu na nativnu hrskavicu (BMC $p < 0.001$, GFP $p = 0.003$, TGF $p < 0.001$) (slika 29.). Analiza varijance pokazala je da razlike postoje i između samih tretiranih skupina ($F_{2,19} = 5.3$, $p = 0.015$). Tukeyeva post-hoc analiza otkriva da su vrijednosti $|E^*|_{\text{micro}}$ značajno niže za TGF skupinu u odnosu na GFP skupinu ($p = 0.014$). Vrijednosti $|E^*|_{\text{micro}}$ također su niže kod TGF skupine u odnosu na BMC skupinu, no razlika nije statistički značajna ($p = 0.138$). Slično tome značajna razlika nije nađena niti usporedbom BMC i GFP skupina ($p = 0.578$).

Spearmanov korelacijski test je pokazao kako je dinamički elastični modulus $|E^*|_{\text{micro}}$ umjereno pozitivno povezan sa sadržajem vode ($r = 0.444$, $p = 0.038$), te umjereno negativno sa sadržajem kolagena tipa II ($r = -0.558$, $p = 0.007$). Povezanost nije utvrđena za sadržaj glikozaminoglikana i kolagena tipa I (vidjeti Tablicu 5).



Slika 28. Reprezentativne krivulje opterećenja i pomaka za nativnu i repariranu hrskavicu mjerene mikrosferičnom sondom nominalnog promjera od $7.5\ \mu\text{m}$.



Slika 29. Vrijednosti dinamičkog elastičnog modulusa $|E^*|_{\text{micro}}$ za repariranu i nativnu hrskavicu. Najniže vrijednosti dobivene su za nativnu hrskavicu iz kontralateralnog koljena, dok su vrijednosti dinamičkog elastičnog modulusa reparirane hrskavice značajno više u svim tretiranim skupinama: $|E^*|_{\text{micro}} = 1.025 \pm 0.098$ (nativna hrskavica), $|E^*|_{\text{micro}} = 1.577 \pm 0.285$ (TGF), $|E^*|_{\text{micro}} = 1.863 \pm 0.079$ (BMC), $|E^*|_{\text{micro}} = 2.025 \pm 0.371$ (GFP).

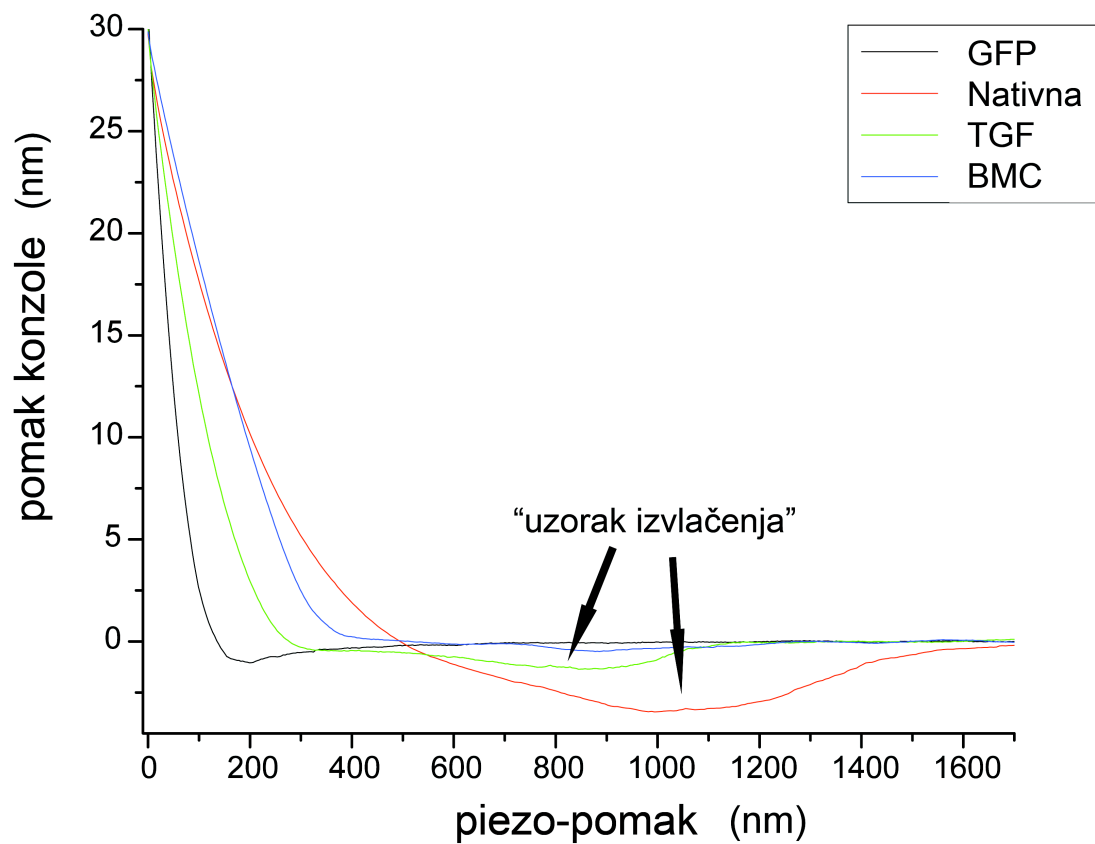
* t-test za zavisne uzorke ($p < 0.05$)

** analiza varijance s Tukeyevim post-hoc testom ($p < 0.05$)

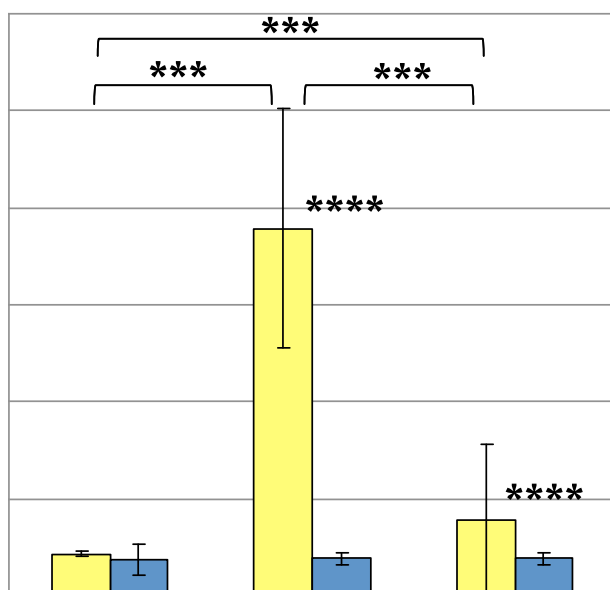
4.3.2. Čvrstoća hrskavice na nanometarskom nivou organizacije tkiva

Reprezentativne krivulje odnosa opterećenja i pomaka za pojedine tretirane skupine i nativnu hrskavicu mjerene na nanometarskom nivou organizacije tkiva prikazane su na slici 30. Sva mjerenja vršena su sa sondom piramidalnog oblika nominalnog radijusa od 20 nm. Dobivene su statistički značajne razlike u vrijednostima dinamičkog elastičnog modulusa $|E^*|_{\text{nano}}$ prilikom usporedbe nativne i reparirane hrskavice za skupine TGF

($p=0.028$) i GFP ($p=0.005$), dok ta razlika nije utvrđena usporedbom skupine BMC i native hrskavice ($p=0.345$)(slika 31.). Kruskal-Wallisov test pokazao je statistički značajnu razliku između samih tretiranih skupina ($p<0.001$), i to za parove BMC vs. GFP ($p=0.004$), BMC vs. TGF ($p=0.001$), GFP vs. TGF ($p=0.007$). Na nanometarskom nivou organizacije tkiva primjećene su razlike u obliku reprezentativnih krivulja opterećenja i odnosa. U slučaju native hrskavice vrlo je izražen tzv. “uzorak izvlačenja” koji je u manjem obimu prisutan i u TGF skupini, dok u BMC i GFP skupinama navedeni uzorak nije detektiran. Spearmanov korelacijski test je pokazao kako je dinamički elastični modulus $|E^*|_{\text{nano}}$ snažno pozitivno povezan sa sadržajem kolagena tipa I ($r=0.799$, $p<0.001$), te umjereno negativno sa sadržajem vode ($r=-0.457$, $p=0.033$). Povezanost nije utvrđena za sadržaj glikozaminoglikana i kolagena tipa II (vidjeti Tablicu 6) .



Slika 30. Reprezentativne krivulje opterećenja i pomaka za nativnu i repariranu hrskavicu mjerene piramidalnom sondom nominalnog promjera od 20 nm. "Uzorak izvlačenja" karakterističan je za nativnu hrskavicu, a diskretno je prisutan jedino u skupini tretiranoj s čimbenikom rasta TGF- β 1.



Slika 31. Vrijednosti dinamičkog elastičnog modulusa E^*_{nano} za repariranu i nativnu hrskavicu. Dobivene vrijednosti dinamičkog elastičnog modulusa ne razlikuju se za nativnu i BMC hrskavicu, dok su iste vrijednosti značajno više za GFP i TGF skupinu: $E^*_{nano} = 19.28 \pm 3$ (nativna hrskavica), $E^*_{nano} = 21.54 \pm 1.24$ (BMC), $E^*_{nano} = 39.26 \pm 104.56$ (TGF), $E^*_{nano} = 189.21 \pm 39.26$ (GFP).

*** Wilcoxonov test nezavisnih parova ($p < 0.05$)

**** Kruskal-Wallisov test i Mann-Whitneyev U test ($p < 0.05$)

	Povezanost [Spearmanov $\rho(p)$]	
	$ E^* _{\text{micro}}$	$ E^* _{\text{nano}}$
GAG	-0.35 (0.108)	-0.24 (0.288)
Kolagen I	-0.08 (0.710)	0.80 (<0.001)**
Kolagen II	-0.56 (0.007)**	0.29 (0.191)
Voda	0.44 (0.038)*	-0.46 (0.033)*

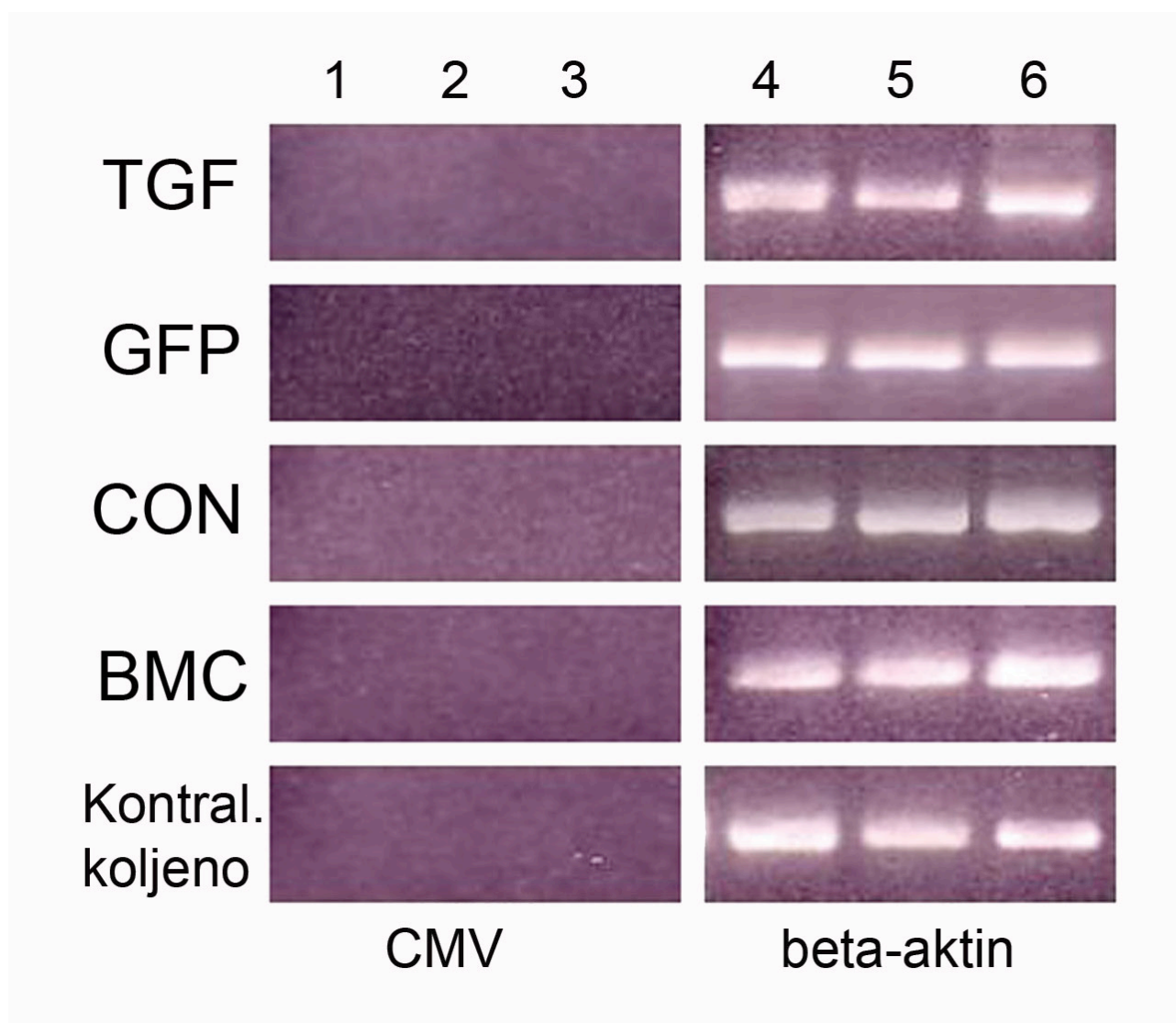
Tablica 7. Korelacijska analiza povezanosti biokemijskih (GAG, kolagen I, kolagen II, voda) i biomehaničkih parametara hrskavičnog reparata.

* Korelacija značajna na razini $p < 0.05$

** Korelacija značajna na razini $p < 0.01$

4.4. Prisutnost adenovirusa u stanicama sinovije

Kako bi se utvrdila razina ekspresije adenoviralnog vektora unutar stanica sinovijalnog tkiva, napravljena je analiza prisutnosti citomegalovirusa koji služi kao promotor. Šest mjeseci nakon samog zahvata, učinjena je PCR analiza upotrebom setova početnica za CMV promotor i ovčji β -aktin. Analizom je obuhvaćeno 5 skupina uzoraka: TGF, GFP, BMC, CON i sinovija iz kontralateralnog koljena. PCR analiza ovih uzoraka 180 dana nakon implantacije nije dokazala prisutstvo CMV promotora niti u jednoj od navedenih skupina. Ekspresija β -aktina detektirana je u svim analiziranim uzorcima (slika 32.).



Slika 32. Ekspresija citomegalovirusnog promotora u stanicama sinovije analizirane metodom polimerazne lančane reakcije i prikazane bojanjem etidijum bromidum pokazuje odsutstvo virusa u svim ispitivanim skupinama. Ekspresija ovčjeg β -aktina detektirana je u svim ispitivanim uzorcima i služi kao kontrola.

5. RASPRAVA

Osvrt na rezultate provedenog istraživanja

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju hipotezu kako je upotrebom skraćenog *ex vivo* protokola za gensku modifikaciju autologne koštane moždine moguće uspješno reparirati hrskavicu, a upotreba čimbenika rasta TGF- β 1 rezultira hrskavicom koja sadrži visoki udio osnovnih sastojaka izvanstaničnog matriksa hijaline hrskavice – glikozaminoglikana i kolagenskih vlakana tipa II. Pored biokemijske analize, to je razvidno iz histološke analize preparata, te iz rezultata biomehaničkog testiranja mikroskopom atomskih sila.

Biokemijska analiza hrskavice u pravilu nam daje informaciju o udjelu pojedinih sastavnih dijelova IM-a, a standardna analiza uključuje određivanje sadržaja GAG-a i pojedinih tipova kolagena (u našem slučaju tipa I i tipa II). Pored ovih standardnih molekula, u našu smo analizu uključili i određivanje udjela vode u repariranom tkivu. Dobiveni rezultati biokemijske analize pokazali su kako je sadržaj GAG-a podjednak u svim tretiranim skupinama, te da odgovara sadržaju GAG-a u nativnoj hrskavici. Ono po čemu se razlikuje TGF tretirana skupina od ostalih je optimalan sadržaj kolagenskih vlakana tipa II, odnosno analiza je pokazala da nema statistički značajne razlike između native hrskavice i TGF tretiranog reparata ($p=0.482$). Sve ostale skupine imaju značajno niži udio kolagena tipa II, koji je karakterističan za hijalinu hrskavicu, i čini oko 90% ukupnog sadržaja kolagenskih vlakana. Upravo su kolagenska vlakna tipa II ključna za strukturalni integritet hijaline hrskavice obzirom da neutraliziraju velike mehaničke sile naprezanja koje se pojavljuju za vrijeme pokretanja zgloba. Ono što donekle umanjuje vrijednost tkiva stvorenog u TGF skupini je visoki udio kolagenskih vlakana tipa I i nizak

sadržaj vode, što pak sugerira da reparat nije idealno hijalino tkivo, već da ima elementa fibrokartilaginoznog reparata.

Osim određivanja biokemijskog sastava repariranog tkiva, jedna od najvažnijih sastavnica svakog istraživanja vezanog uz obnovu hrskavice jest histološka analiza. U našem istraživanju smo prema preporukama Odbora za histologiju Međunarodnog društva za istraživanje hrskavice (*ICRS Histological Endpoint Committee*) koristili dvije metode bojanja: hemalaun eozin (HE) i safranin-O.¹³⁷ HE je osnovna metoda bojanja kojom se dobro prikazuje osnovna morfologija preparata, dok je safranin-O specijalna boja kojom se dobro prikazuju glikozaminoglikani IM-a. Rosenberg¹⁴¹ navodi kako je safranin-O kationska boja, te se jedna molekula boje veže na jednu negativno nabijenu skupinu hondroitin 6-sulfata ili keratin-sulfata, što znači da na fiksiranim preparatima dobro korelira s fiksnim negativnim nabojem glikozaminoglikana. Poboljšanje preciznosti analize GAG-a moguće je ostvariti dodatnim uvođenjem reproducibilnog semi-kvantitativnog sistema mikrospektrometrijom i računalnom analizom slike.¹⁴² Dobiveni rezultati su pokazali da je kvaliteta hrskavičnog reparata u svim transplantiranim skupinama bolja od kontrolne skupine, pa tako srednji ICRS skor za negativnu kontrolnu skupinu iznosi 6.5 dok su dobiveni skorovi za ostale skupine oko 11 (BMC=11.5, GFP=11.0, TGF=11.0). Također valja napomenuti da su vrijednosti ocjenskog kriterija za distribuciju stanica statistički značajno veći jedino u slučaju TGF skupine u odnosu na kontrolnu skupinu ($p=0.002$). To konkretno u ovom slučaju znači kako su u srednjem i dubokom sloju hondrociti kolumnarno organizirani, što pak ukazuje na normalnu maturaciju tkiva.

Osvrt na model hrskavičnog oštećenja koji je korišten u istraživanju

Jedno od ključnih pitanja na koje je ovo istraživanje pokušalo dati odgovor jest: da li je moguće primjeniti predloženi skraćeni *ex vivo* protokol u svakodnevnoj kliničkoj praksi? Kako bismo mogli odgovoriti na ovo pitanje bilo je potrebno odabrati primjeren pretklinički model koji će vjerno simulirati uvjete i probleme s kojima se susreće ortoped u liječenju hrskavičnih oštećenja. U odabiru modela najvažniji kriteriji su bili visoka translacijska vrijednost modela, upotreba instrumenata i opreme koja se već primjenjuje u humanoj ortopediji, kao i izvođenje cijelog zahvata u jednom koraku.

Prema podacima iz literature prosječni volumen hrskavičnog oštećenja u ljudi iznosi 500 mm³, a u 95% slučajeva radi se o parcijalnom hrskavičnom oštećenju bez zadiranja u suphondralnu kost.¹⁴³ Upravo je potonji podatak bio ključan u odabiru modela obzirom na debljinu hrskavičnog sloja u pojedinim životinja. Miševi i štakori su najčešće korišteni animalni modeli u preliminarnim istraživanjima u ortopediji, i u pravilu se koriste za inicijalne *in vivo* eksperimente kojima je cilj dokazati valjanost koncepta (engl. proof-of-concept). U slučaju istraživanja vezanih za hrskavicu najčešće se koristi model heterotopične hondrogeneze gdje se ispitivani biomaterijali implantiraju supkutano u području leđa ili intramuskularno.^{144,145} Iako je upotreba glodavaca vrlo praktična obzirom na njihovu veličinu i ekonomičnost, kao model su izuzetno nepovoljni u smislu istraživanja lokaliziranih hrskavičnih oštećenja, i to poglavito iz razloga što imaju vrlo male zglobove, hrskavica zgloba je debljine svega nekoliko stanica, hrskavična ploča rasta se ne zatvara, a potencijalno oštećenje je premalo da bi imalo bilo kakvu translacijsku vrijednost.¹⁴⁶ Veći broj studija koristi kuniće kao model obzirom da su relativno ekonomični, skeletalnu zrelost dostižu s 9 mjeseci, a u biomedicinskim istraživanjima se koriste već dugi niz desetljeća.¹⁴⁷ Osnovni problem ovog modela je vrlo tanka hrskavica koja mjeri svega 0.3 mm, a uzevši u

obzir da je prosječna dubina oštećenja 3 mm to znači da je preko 90% samog oštećenja smješteno u suphondralnoj kosti. Psi se vrlo rijetko koriste kao model u istraživanju hrskavičnih oštećenja prvenstveno zbog društveno prihvaćene uloge psa kao čovjekovog prijatelja, iako su kao model vrlo prihvatljivi obzirom na debljinu hrskavice, mogućnost naknadne artroskopije (engl. "second look" arthroscopy) i biomehaničkih uvjeta opterećenja zgloba koji su slični onima kod čovjeka.¹⁴⁸ Među najčešće korištenim životinjama u istraživanjima hrskavičnih oštećenja su ovca i koza. Radi se o relativno velikim životinjama čija anatomija koljena dobro korelira s ljudskim, što umnogome olakšava kirurški zahvat kao i potencijalnu naknadnu artroskopiju. Prema dostupnim literaturnim podacima debljina hrskavice medijalnog kondila ovce iznosi između 0.4 do 1.68 mm, što omogućava pravljenje djelomičnih hrskavičnih oštećenja bez zadiranja u suphondralnu kost.¹⁴⁹ S druge strane ovakva varijabilnost debljine hrskavice ima i svoju lošu stranu obzirom da pojedina oštećenja mogu varirati u svom volumenu, što u konačnici može rezultirati inkonzistentnim rezultatima reparacije. Kao najveći model za istraživanja ovog tipa na raspolaganju nam stoji konj. Radi se o vrlo skupom modelu koji zahtjeva posebne štale i kirurške instrumente, a sama težina životinje nerijetko je 400-500 kg što zahtjeva vrlo pažljiv postoperacijski protokol u smislu mehaničkog opterećenja. Također valja napomenuti kako se konji ne uzgajaju za biomedicinska istraživanja, što znači da je vrlo teško naći dovoljan broj istovjetnih životinja za homogenu studiju. Velika je prednost ovog modela vrlo debela hrskavica koja mjeri između 1.75 do 2 mm, što odgovara debljini ljudske hrskavice koja mjeri 2.2 mm.¹⁵⁰ Iako morfologijom, debljinom hrskavice i mogućnošću naknadne artroskopije ovaj model ponajviše korelira s ljudskim hrskavičnim oštećenjem, logistički problemi u kombinaciji s vrlo velikim mehaničkim opterećenjima čine ga relativno nedostupnim širem krugu znanstvenika.

Nakon pažljive analize svih dostupnih modela, odlučili smo se za model parcijalnog hrskavičnog oštećenja na medijalnom kondilu koljena ovce. Ovaj model vrlo dobro korelira s anatomijom ljudskog koljena, parcijalno hrskavično oštećenje promjera 6.2 mm smješteno je na mjestu koje je najčešće zahvaćeno u kliničkoj praksi, a debljina hrskavice omogućila nam je da suphondralna kost ostane netaknuta. Također valja napomenuti kako se radi o relativno ekonomičnom modelu obzirom da su ovce prilično otporne životinje koje vrlo dobro podnose operaciju, te da njihov smještaj i prehrana ne predstavljaju preveliki problem. Samo oštećenje načinjeno je standardnim instrumentom za mozaikplastiku koje je već dugi niz godina prisutan u operacijskim salama diljem svijeta.

Osim navedenih prednosti valja spomenuti i ograničenja navedenog modela kojima se mogu pripisati i određene inkonzistentnosti primjećene u rezultatima ovog istraživanja. Primjerice varijabilnost debljine hrskavice rezultira različitim konačnim volumenom samog oštećenja, što znači da je u oštećenje manjeg volumena transplantirano manje progenitornih stanica. Svakako jedno od najvažnijih ograničenja primjenjenog modela i protokola jest i činjenica kako zbog praktičnih razloga nije bilo moguće kontrolirati mehaničko opterećenje operiranih životinja. Nedvojbeno je dokazano kako su hondrociti vrlo osjetljivi na različite oblike mehaničkih sila, no da potpuno drukčije reagiraju na statičku i dinamičku kompresivnu silu.¹⁵¹ U prirodi je hijalina hrskavica izložena djelovanju dinamičke kompresivne sile koja djeluje ciklički u frekvencijskom rasponu od 0.5 – 3 Hz što odgovara frekvenciji normalnog ljudskog hoda. Tako je primjerice utvrđeno kako statička kompresija hondrocita rezultira smanjenjem udjela GAG-a i kolagena II, a dovodi do povećanja udjela kolagena tipa I.¹⁵² Istovremeno cikličko dinamičko opterećenje dovodi do povećanja sinteze GAG-a i kolagena II, a smanjuje udio

kolagena I.¹⁵³ U skladu s tim, dobro je poznato iz kliničke prakse kako je pravilan postoperacijski protokol rehabilitacije ključan čimbenik uspjeha kod korištenja tehnika stimulacije koštane moždine ili transplantacije hondrocita. Optimalan protokol uključuje kontinuirano pasivno razgibavanje, te hod uz pomoć štaka s dodiranjem podloge tijekom 6 do 8 tjedana.¹⁵⁴ Ovakav protokol omogućava stvaranje optimalnih mehaničkih uvjeta unutar zglobova koji omogućavaju stabilno diferenciranje stanica u hondrocite koji potom stvaraju i organiziraju komponente ekstracelularnog matriksa. Obzirom kako je ovakve uvjete bilo nemoguće postići tijekom našeg istraživanja, moguće je pretpostaviti kako je djelovanje velikih statičkih kompresivnih sila na sam transplantat tijekom kritičnog perioda diferencijacije spriječilo diferencijaciju svih stanica u hondrocite, odnosno dio stanica se diferencirao u fibroblaste. To je razvidno iz visokog udjela kolagena tipa I koji je karaktersitičan za fibrokartilaginozni reparat, a ne za hijalinu hrskavicu. Također nas na takav zaključak upućuje i nizak udio vode u samom reparatu.

Kao moguće poboljšanje modela u obzir dolazi smještaj samog oštećenja na trohleju zglobova čime bi se barem djelomično neutralizirale velike mehaničke sile, no taj smještaj je puno rjeđi u kliničkoj praksi što bi značajno umanjilo translacijsku vrijednost istraživanja. Druga opcija je načiniti osteohondralno oštećenje koje je puno dublje u odnosu na djelomično hondralno, volumen transplantiranog ugruška je puno veći, a sam je ugrušak zbog toga znatno stabilniji. Na žalost i ova rješenja nisu u potpunosti idealna, obzirom da bi zadiranje u suphondralnu kost neizbježno rezultiralo ulaskom koštane moždine u oštećenje što bi zamaglilo stvaran doprinos predložene metode u liječenju hrskavičnih oštećenja.

Mogućnost primjene genski promijenjenog ugruška koštane moždine u kliničkoj praksi

Kao što je već spomenuto, jedan od ciljeva ovoga istraživanja bilo je provjeriti da li je moguće ovaj protokol primjeniti u uvjetima operacijske sale bez upotrebe dodatnih instrumenata i opreme, a u vremenu koje nije duže od oko 2h koliko u prosjeku traju ortopedski zahvati na otvorenom koljenu.

Obzirom na rezultate kao i na iskustvo stečeno tijekom provođenja ovog istraživanja, mišljenja sam kako je predloženi skraćeni *ex vivo* protokol za transplantaciju genski promijenjenog ugruška koštane moždine u cijelosti moguće izvesti u postojećim operacijskim salama s postojećim instrumentarijem. Sama tehnika je relativno jednostavna, te ju je moguće vrlo uspješno izvesti u svega nekoliko koraka. Kirurški tim sastojao se od 3 ortopeda od čega su dva medijalnim parapatelarnim rezom pristupili na koljeno, te potom instrumentom za mozaikplastiku načinili na medijalnom kondilu parcijalno hrskavično oštećenje. Par minuta prije negoli su bili gotovi, dali su znak trećem članu da pristupi uzimanju autologne koštane moždine iz desnog grebena ilijačne kosti. Minimalnim rezom od svega nekoliko centimetara pristupi se na greben, te se standardnim iglama za punkciju koštane moždine uzme dovoljna količina moždine. Sam adenoviralni vektor je proizveden u laboratoriju, a u salu je dopremljen u frižideru, te neposredno prije punkcije raspoređen u alikvote na 96-rupičnoj ploči koja je stajala na posebnom sterilnom stolu. Potom je koštana moždina u tekućem stanju prebačena u rupice s adenoviralnom suspenzijom, dobro promiješana i ostavljena da se zgruša tijekom 10 minuta. Kada je nastupilo zgrušavanje, moždina je transplantirana u oštećenje, modelirana po volumenu oštećenja, te ostavljena tako slijedećih 5 minuta. Kada smo se uvjerali u stabilnost transplantata, zglobov je ispran fiziološkom otopinom i zatvoren po slojevima. Preostala

adenoviralna suspenzija kao i svi korišteni instrumenti potopljeni su u varikinu kako bi se virus u potpunosti neutralizirao. Krivulja učenja je bila relativno strma, i nakon prvih nekoliko životinja cijeli zahvat je bilo moguće izvesti unutar sat vremena.

Kao prilog budućim istraživanjima predlažem uvođenje određenih tehnoloških poboljšanja koje bi metodu još više mogle pojednostavniti i samim tim približiti uvođenju u kliničku praksu. Prije svega potrebno je konstruirati sterilnu posudu za jednokratnu upotrebu koja će sadržavati optimalnu količinu virusa za određeni volumen hrskavice. Idealno bi bilo kada bi se promjer posude mogao podešavati, što bi omogućilo dobivanje "genskih čepova" (engl. "gene plugs") različitih promjera i volumena. Posuda bi imala cilindričan oblik (poput klasične šprice) gdje bi se kroz jedan kraj aspirirala koštana moždina i mješala s adenoviralnom suspenzijom, a kroz drugi bi se jednostavnim potiskom zraka transplantat ubacio na mjesto prethodno obrađenog oštećenja. Ovakvo tehnološko poboljšanje spriječilo bi potencijalno širenje virusa, sam ugrušak ne bi bio izložen patogenima iz zraka, a najvjerojatnije bi se ovo rješenje moglo adaptirati i za artroskopsko korištenje.

Nedostaci trenutačno korištenih metoda u liječenju hrskavičnih oštećenja i razlozi za primjenu genske terapije i tkivnog inženjeringa

Kao što je već i spomenuto u uvodu, dvije se standardne tehnike danas primjenjuju u liječenju hrskavičnih oštećenja: mikrofrakture i autologna transplantacija hondrocita (ATH). Obje metode imaju svoje prednosti i mane, no uz pravilnu indikaciju i tehniku obje daju vrlo dobre kliničke rezultate u smislu smanjenja bolova i povećanja opsega pokreta zgloba. Unatoč tome niti jedna od ove dvije metode ne dovodi do stvaranja hijaline hrskavice, već se u najboljem slučaju radi o tkivu koje je slično hijalinoj hrskavici, no sadrži

i fibrokartilaginozne elemente. Ono što je zajedničko svim postojećim metodama za liječenje hrskavičnih oštećenja (pa i ovim dvijema) jest da niti jedna ne upotrebljava sva tri potrebna sastojka za uspješnu regeneraciju hijaline hrskavice – stanice, bioaktivne molekule i nosač. Same stanice su ključne za stvaranje i organiziranje izvanstaničnog matriksa, bioaktivne molekule usmjeravaju diferencijaciju i sazrijevanje hondrocita, a nosač služi kao trodimenzionalna podrška stanicama u fazi dok još nisu stvorile dovoljnu količinu matriksa. Uz činjenicu da je hrskavica tkivo bez krvne opskrbe postaje jasno zašto je regeneracija hijaline hrskavice “sveti gral” ortopedske znanosti. Znanstvenici diljem svijeta su u potrazi za idealnom metodom, no idealan rezultat za sada izostaje.

Otkrićem i postupnom upotrebom različitih bioaktivnih molekula, prvenstveno čimbenika rasta započeto je sasvim novo razdoblje moderne ortopedije i upravo je upotreba čimbenika rasta u kombinaciji s tkivnim inženjeringom metoda čija primjena u svrhu liječenja hrskavičnih oštećenja najviše obećava. Kao što je u uvodu spomenuto, čimbenici rasta su citokini koji imaju regulatornu funkciju u procesu cijeljenja tkiva mišićno-koštanog sustava. Ovi mali peptidi su sintetizirani od strane rezidentnih stanica na mjestu ozljede (hondrociti, mezenhimalne matične stanice i sl.), odnosno upalnih stanica koje migriraju na mjesto ozljede. Mnogi od ovih faktora utječu na metabolizam hondrocita, a samim tim i na proces cijeljenja hrskavice. Najčešće korišteni čimbenici rasta koji dokazano utječu na cijeljenje hrskavice *in vivo* su IGF-1, TGF- β , BMP-2 i -7, a u novije vrijeme i neki transkripcijski faktori kao što je SOX-9. Iako je teško sa sigurnošću točno utvrditi biološki učinak svakog pojedinog čimbenika rasta, rezultati provedenih animalnih studija su nedvojbeno pokazali da primjena ovih citokina poboljšava histološki izgled obnovljene hrskavice. Tako je primjerice dokazano da IGF-1 i TGF- β moduliraju sintezu IM-a, a BMP-2 i -7 sudjeluju u rastu i diferencijaciji mezenhimalnih stanica u hondroblaste i

osteoblaste. Iako se direktna primjena čimbenika rasta pokazala učinkovitom, njihova je klinička primjena prvenstveno limitirana poteškoćama u dovođenju i održavanju adekvatnih koncentracija citokina na mjestu cijeljenja hrskavice. Zbog kompleksnosti samog procesa regeneracije hrskavice, potrebna je barem neko vrijeme stalna koncentracija čimbenika rasta. Također se pokazalo da je kratki biološki poluživot ovih citokina dodatni limitirajući čimbenik. Kako bi se premostile ove poteškoće primjenjivani su različiti nosači, pumpe i heparin kako bi se postigle i održale adekvatne koncentracije čimbenika rasta. Iako su postignuta određena poboljšanja u dostavi i održavanju koncentracije citokina, krajnji ishod nije niti iz daleka zadovoljavajući.

Pojavom nove tehnologije kojom je omogućen prijenos gena pojavila se jedinstvena mogućnost da se gore navedeni problemi u lokalnoj primjeni čimbenika rasta riješe. Prema definiciji genska terapija je tehnika kojom se mjenja stanična genska informacija. To znači da bi u slučaju oštećenja hrskavice trebalo prenijeti genski materijal za kodiranje određenih čimbenika rasta u hondrocyte, odnosno progenitorne stanice koje bi potom proizvodile taj specifični čimbenik u terapijski zadovoljavajućim koncentracijama kroz određeno vremensko razdoblje. Mnoge studije su dokazale mogućnost takvog prijenosa gena na stanice sinovije zgloba, i danas su, primjerice, rezultati tih studija osnova kliničkih pokusa kojima se evaluira genska terapija reumatoidnog artritisa.

Upravo zbog navedenih razloga osmišljena je i ova studija, koja za konačni cilj ima ukazati na prednosti i mane predloženog protokola u liječenju hrskavičnih oštećenja, odnosno procijeniti mogućnost primjene metode u liječenju ljudi. Predloženo rješenje zadovoljava sve postulate suvremenog tkivnog inženjeringa hrskavice jer predviđa upotrebu stanica (progenitorne stanice koštane moždine), bioaktivne molekule (TGF- β 1) i prirodnog nosača (ugrušak koštane moždine).

Upotreba TGF- β 1 čimbenika rasta u liječenju oštećenja hrskavice i prisutnost adenoviralnog vektora u stanicama sinovije

TGF- β 1 se uobičajeno koristi kao ključan čimbenik rasta u regulaciji hondrogeneze u većini *in vivo* i *in vitro* pokusa, i to ponajviše zbog činjenice da vrlo snažno stimulira proliferaciju stanica i sintezu osnovnih komponenti IM-a – kolagenskih valakana i GAG-a.^{155,156,157} Iako su rezultati provedenog istraživanja pokazali poboljšanje kvalitete hrskavičnog reparata u skupini tretiranoj s TGF- β 1, rezultati nisu idealni. Slične rezultate opisuju primjerice Guo i sur.¹⁵⁸ koji su koristili model potpunog hrskavičnog oštećenja kod kunića. U tom istraživanju MSS-e koštane moždine transducirane su s TGF- β 1, umetnute u kitosanski nosač i transplantirane u oštećenje. 12 tjedana kasnije oštećenje je bilo ispunjeno tkivom nalik na hrskavično, s visokim udjelom GAG-a i kolagena tipa II. Iako se upotreba jednog čimbenika rasta čini vrlo praktičnom, valja napomenuti kako je nerealno za očekivati da jedan čimbenik rasta može na zadovoljavajući način potaknuti i regulirati kompleksan, fino reguliran proces hondrogeneze. Na tom tragu su i neka novija istraživanja kojima se pokušava iskoristiti sinergistični učinak više čimbenika rasta i/ili transkripcijskih čimbenika. Tako su primjerice Steinert et al.¹⁵⁹ nedavno pokazali sinergističan učinak ko-ekspresije TGF- β 1, IGF-1 i BMP-2 na hondrogenezu staničnih kultura. Također valja napomenuti da već spomenuti transkripcijski čimbenici poput SOX-9 i Wnt nisu hondrogeni sami po sebi, no uslijed njihovog djelovanja stanice postaju puno osjetljivije na djelovanje čimbenika rasta. U skladu s tim, upotreba više različitih gena za kodiranje različitih bioaktivnih molekula možda je realnija opcija, i dodatna istraživanja su potrebna kako bi se utvrdila optimalna kombinacija, kao i slijed primjene ovih molekula.

Obzirom na činjenicu kako većina ortopedskih bolesti i stanja ne spada u skupinu teških bolesti s potencijalnim smrtnim ishodom, primjena genske terapije bazirane na virusnim vektorima oduvijek izaziva brojne kontroverze. Iako se radi o vrlo učinkovitoj metodi u smislu genskog prijenosa i ekspresije, virusni vektori zazivaju imunološki odgovor domaćina, a prisutnost virusa u okolnim tkivima može izazvati neugodne nuspojave. Najvažniji neželjeni učinak direktne intraartikularne primjene TGF- β 1 je pojava hondrofitna na rubovima zglobova, koji vremenom mogu postati pravi osteofiti.¹⁶⁰ Kako se radi o vrlo ozbiljnoj nuspojavi, jedan od najvažnijih ciljeva ovog istraživanja bio je utvrditi da li postoji „istjecanje“ vektora iz transplantata, te rezidualnog prisustva virusa u stanicama sinovije. Originalnim istraživanjem Paschera i suradnika¹⁶¹ dokazano je prisutstvo svega nekoliko pozitivnih stanica u području sinovijalne ovojnice direktno iznad transplantata, dok pozitivne stanice nisu pronađene u ostalim djelovima ovojnice. Neposredno nakon žrtvovanja učinjena je inspekcija svih dijelova zglobova, no nisu nađeni osteofiti kao niti znakovi artrofibroze. PCR analizom uzoraka sinovijalnog tkiva nije utvrđena rezidualna prisutnost virusa u niti jednoj od ispitivanih skupina, što upućuje na zaključak kako nije došlo do „istjecanja“ virusa u okolno tkivo sinovije.

U ovom je istraživanju korišten adenoviralni vektor prve generacije koji se odlikuje jednostavnošću izrade i velikim kapacitetom pohrane genskog materijala. Iako se radi o virusu koji u ljudi uzrokuje simptome prehlade, trenutačno se intenzivno radi na razvoju viralnih vektora koji će zadržati visoku učinkovitost transdukcije, a čija će se potencijalna patogenost još više smanjiti. Trenutačno je kandidat broj jedan za kliničku upotrebu virus koji je sličan adenovirusu, odnosno AAV (engl. adeno-associated virus) koji nije patogen za ljude, a trenutačno se njegova primjena testira u I. fazi kliničkog ispitivanja.¹⁶² Primjer uspješne primjene AAV-a je studija koju su proveli Pagnotto i sur.¹⁶³ koji su transducirali MSS-e uz pomoć AAV-a koji je nosio gen za kodiranje TGF- β 1, te potom takve stanice

transplantirali u koštano-hrskavično oštećenje. Njihovi rezultati su pokazali kako je razina ekspresije postupno opadala sa 100% nakon 2 tjedna na 17% nakon 12 tjedana, što potvrđuje tezu kako je ovom metodom moguće osigurati dostatnu količinu bioaktivnih molekula tijekom vremena potrebnog za reguliranje procesa hondrogeneze.

Određivanje biomehaničkih svojstava hrskavice upotrebom IT AFM metode

U analizi hrskavice znanstvenici i kliničari se tradicionalno služe biokemijskom analizom udjela pojedinih komponenata IM-a, te histološkim i histomorfometrijskim analizama koje daju podatke o mikrostrukturi i organizaciji samog tkiva. Napretkom molekularne medicine sve se više koriste i metode kojima možemo dokazati ekspresiju određenih gena koji reguliraju procese unutar same hrskavice. Ipak, valja se prisjetiti kako je hrskavica primordijalno, visokosofisticirano tkivo koje je evolucijom optimizirano za obavljanje osnovne funkcije zglobova – kretanje. Svojom strukturom i površinom hrskavica je upravo idealno dizajnirana za neutraliziranje velikih mehaničkih sila koje djeluju na zglobne plohe tijekom kretanja. Imajući to na umu, sve se češće u analizi hrskavice koristi i analiza biomehaničkih svojstava tkiva. U skladu s tim, pored biokemijskih i histoloških parametara, cilj je ovog istraživanja bio odrediti i čvrstoću reparirane hrskavice uporabom mikroskopa atomskih sila indentacijskog tipa (IT AFM).

Prema definiciji čvrstoća je mehanički parametar koji opisuje odnos između primjenjene, nedestruktivne sile i resultantne deformacije samog materijala. Čvrstoću možemo mjeriti na svim nivoima unutrašnje organizacije materijala, a varira obzirom na prirodu sile (tenzija, kompresija, smik), kao i na frekvenciju primjene (monotona, ciklička). Obzirom na svoj sastav i strukturu hijalina hrskavica se ponaša kao viskoelastično kruto tijelo, što znači da mehanička svojstva tkiva ovise o omjeru primjenjene sile i

naprezanja.¹⁶⁴ Također treba napomenuti da pod cikličkim opterećenjem primjenjena sila i naprezanje nisu u istoj fazi. Primjerice, kod primjene kompresivnih sila, omjer primjenjene sile i naprezanja nazivamo *dinamičkim elastičnim modulusom* $|E^*|$, a dobivamo ga vektorskim zbrojem modulusa pohrane E' (u-fazi, elastična komponenta) i modulusa gubitka E'' (izvan-faze, viskozna komponenta). Biomehaničke osobine hrskavice se razlikuju od krutih materijala koji imaju elastična svojstva (npr. čelik) kod kojih su ciklički primjenjena sila i naprezanje u istoj fazi, nema gubitka energije u elastičnom rasponu, a omjer primjenjene sile i naprezanja nazivamo *elastičnim modulusom* E .

U određivanju mehaničkih parametara kao što su čvrstoća i krutost u pravilu se rabe dobro definirana indentacijska mjerenja. Takva mjerenja su originalno razvijena za ispitivanje materijala kao što su keramika ili metali, no u zadnje vrijeme sve se više primjenjuju i u ispitivanju bioloških tkiva. Indentacijski uređaji razvijeni za mjerenje biomehaničkih svojstava hrskavice u pravilu koriste sonde cilindričnog ili sferičnog vrha promjera nekoliko milimetara.^{165,166} Takvim je mjerenjima moguće dobiti podatke koji opisuju čvrstoću hrskavice na milimetarskom nivou, no nije moguće izmjeriti finije lokalne varijacije u čvrstoći tkiva koje su odraz ultrastrukturnih razlika na molekularnom nivou.

Kako bi prevazišli ova ograničenja Stolz i sur.¹⁶⁷ su predložili novu metodu temeljenu na uporabi mikroskopa atomskih sila koju su nazvali IT AFM. Upotrebom njihovog protokola moguće je izmjeriti apsolutne vrijednosti dinamičkog elastičnog modulusa $|E^*|$ na dva različita nivoa organizacije tkiva – mikrometarskom i nanometarskom. Sama metoda tehnički je izvediva zbog toga što se za mjerenja koriste sonde s dva različita vrha: mikrosferični vrh za mjerenja na mikrometarskog skali, i oštri vrh piramidalnog oblika za nanometarska mjerenja. Prema njihovim rezultatima razlika između $|E^*|_{\text{micro}}$ i $|E^*|_{\text{nano}}$ je reda veličine 100 puta, a zaključak da se na mikrometarskoj

skali organizacije tkiva hrskavica ponaša kao relativno amorfna tvar, dok se na nanometarskoj skali počinju razaznavati ultrastrukturne razlike.

Rezultati provedenog istraživanja odgovaraju gore navedenima, i izmjerene vrijednosti dinamičkog elastičnog modulusa $|E^*|_{\text{micro}}$ iznose ~ 1 MPa, a $|E^*|_{\text{nano}}$ 0.02 MPa što je usporedivo s vrijednostima ljudske hrskavice koje iznose 2.6 MPa i 0.015 MPa kod zdravih osoba bez osteoartritisa.^{168,169} Očekivano, vrijednosti mikročvrstoće bile su najniže u slučaju native hrskavice, a postupno se povećavaju od TGF, preko BMC do GFP skupine (vidi slike 29. i 30.). Ovakvi rezultati sugeriraju da je novostvorena hrskavica u skupini TGF u biomehaničkom smislu bolja od ostale dvije skupine, odnosno da je najbližija native hrskavici, što bi bilo u skladu s rezultatima dobivenim određivanjem biokemijskih parametara koji su pokazali da je jedino TGF skupina ima visok udio kolagena II, a stanice su ipak kolumnarno organizirane. Nanometarska mjerenja su pak pokazala kako su vrijednosti $|E^*|_{\text{nano}}$ optimalne u BMC skupini dok su u TGF skupini nešto lošiji. Najveće vrijednosti (odnosno najveća čvrstoća) dobivene su za GFP skupinu. Objašnjenje ovih rezultata potrebno je potražiti u veličini korištene sonde, odnosno razlučivosti koje takvim mjerenjima postižemo. Naime, mikrosferičnom sondom veličine 7.5 μm nije moguće utvrditi suptilne razlike na molekularnom nivou, te se sukladno predviđanjima, hrskavica ponaša kao relativno amorfna tvar. Nanosonda promjera 20 nm manja je od promjera kolagenog vlakna koje u prosjeku mjeri oko 50 nm, te je u mogućnosti zabilježiti lokalne promjene u gustoći i rasporedu pojedinih kolagenih vlakana.¹⁷⁰ Relativno visok udio kolagena tipa I i II, te nizak udio vode uzrok su povećanog modula elastičnosti u TGF skupini.

Potrebno je i osvrnuti se na tzv. “uzorak izvlačenja” koji je karakterističan za native hrskavicu, a pripisuje se visokom udjelu GAG-a, odnosno fiksnog negativnog

naboja. Prilikom faze izvlačenja tijekom indentacijskog testiranja, nanosonda je privučena spomenutim nabojem, te se to manifestira prikazanim oblikom krivulje. Biokemijska analiza nije pokazala razlike u sadržaju GAG-a između ispitivanih skupina, te je moguće da se radi o artefaktu. Ipak, mišljenja sam kako se radi o intrigantnom podatku koja sugerira daljnja istraživanja u smislu razjašnjavanja opaženog fenomena.

Predviđanje o daljnim istraživanjima liječenja hrskavičnih oštećenja

Obzirom na sve aktivniju mlađu populaciju, kao i na produljenje životnog vijeka i povećanje incidencije osteoartritisa, nije teško zaključiti kako regeneracija hrskavice predstavlja veliki izazov za modernu ortopediju i ortopedsku znanost. Prije 15 godina, ortopedija je ušla u eru tkivnog bioinženjeringa i molekularne znanosti, stvorivši potpuno novi smjer koji danas nazivamo regenerativna ortopedija. Za razliku od endoproteza koje su revolucionarizirale ortopediju prije 40-ak godina, a koje se temelje na zamjeni zglobova umjetnim materijalima poput metala, plastike ili keramike, regenerativna ortopedija za cilj ima potpunu obnovu samih tkiva i tkivnog okoliša. Teško je prognozirati da li ćemo ikada biti u mogućnosti proizvoditi potpuno prirodne, individualno prilagođene dijelove zglobova, no sasvim je sigurno da su otvorena vrata neslućenim mogućnostima.

Jedno od najvažnijih strateških pitanja jest: da li će se istraživanja kretati u smjeru *in vitro* proizvodnje različitih transplantata ili će se više bazirati na indukciji i usmjeravanju unutrašnjih mehanizama regeneracije hrskavice (tzv. facilitirana endogena regeneracija)?¹⁷¹ Odgovor na ovo pitanje leži u razini sofisticiranosti dostupnih transplantata, kao i na dobi i karakteristikama samih bolesnika. Za pretpostaviti je da će se kod mlađih bolesnika ipak ići u smjeru aktivacije unutrašnjih mehanizama regeneracije, dok će se kod starije populacije, čiji su regenerativni mehanizmi relativno kompromitirani

pribjegavati rješenjima tkivnog inženjeringa i transplantacije. Slično tome, kod manjih hrskavičnih oštećenja primjenjivat će se endogena regeneracija, a kod većih tkivna rekonstrukcija. Drugim riječima, za isti problem potrebno je raspolagati paletom različitih rješenja koje će se individualizirano primjenjivati u odnosu na potrebe samog bolesnika. Iako su se do sada biotehnološke kompanije uglavnom odlučivale za jedno rješenje, ovakav razvoj situacije uvjetovat će prilagođavanje u procesu proizvodnje, te upotrebu različitih materijala i stanica kako bi se mogao proizvesti optimalan transplantat. Isto vrijedi i u slučaju odabira metode za pospješivanje endogenih procesa regeneracije.

Već danas je lista mogućnosti vrlo velika i uključuje upotrebu progenitornih stanica (nativnih ili genski promijenjenih; autolognih, heterolognih ili ksenolognih), nosača (pasivnih ili aktivnih; "pametnih"; sa stanicama ili bez njih), te različitih bioaktivnih molekula koje reguliraju hondrogenezu ili djeluju protuupalno (čimbenici rasta, transkripcijski čimbenici i antikatabolički čimbenici). Također je moguće predvidjeti i razvoj metoda za evaluaciju samog liječenja. Danas se u kliničkoj praksi kao zlatni standard koristi klinički pregled, i uspjeh se vrednuje odsutstvom boli i poboljšanjem opega pokreta. Iako su više nego korisni, ovi parametri ne dopuštaju objektivnu analizu novostvorenog tkiva u samom oštećenju. Prema tome realno je za očekivati razvoj novih tehnologija koje će omogućiti neinvazivni prikaz i analizu transplantata i njegove okoline, kao i definiranje metaboličkih biljega za procjenu kvalitete novostvorenog tkiva. Iako su zamjetna tehnološka i metodološka poboljšanja u primjeni magnetske rezonance i analize tjelesnih tekućina, još uvijek dobro definirani kriteriji ne postoje.¹⁷²

6. ZAKLJUČAK

Rezultati provedenog istraživanja potvrdili su postavljenu hipotezu, te pokazali kako je primjenom predloženog, skraćenog, *ex vivo* protokola za upotrebu genski promijenjenog ugruška autologne koštane moždine moguće dobiti hrskavični reparat zadovoljavajuće kvalitete, a uporaba faktora rasta TGF- β 1 dodatno poboljšava kvalitetu novostvorenog tkiva. Prema tome moguće je zaključiti slijedeće:

1. predloženu metodu moguće je u jednom koraku jednostavno i uspješno primjeniti u uvjetima operacijske sale, i to uz postojeći instrumentarij i opremu;
2. transplantacijom ugruška autologne koštane moždine moguće je dobiti reparat hrskavice koji je kvalitativno lošiji od native hrskavice, no puno bolji od kontrolne skupine gdje je ostalo prazno oštećenje što je razvidno iz analize i semikvantitativnog bodovanja histoloških preparata;
3. dodatno poboljšanje kvalitete reparirane hrskavice moguće je postići prijenosom gena za kodiranje TGF- β 1, a što je dokazano analizom biokemijskih i biomehaničkih parametara novostvorenog tkiva koje je pokazalo optimalan udio GAG-a i kolagena tipa II u skupini tretiranoj s TGF- β 1;
4. nisu utvrđene nuspojave primjene virusnog vektora unutar samog zgloba, a PCR analiza je pokazala odsutstvo vektora u okolnim stanicama sinovijalne ovojnice, što sugerira da je metoda sigurna i da ne dolazi do "istjecanja" vektora iz transplantiranih ugrušaka;
5. IT AFM je izvrsna komplementarna metoda za analizu kvalitete novostvorene hrskavice, a omogućava nam analizu i usporedbu biomehaničkih parametara na mikro- i nanometarskom nivou organizacije tkiva;

6. za poboljšanje i optimizaciju metode, kao i za procjenu mogućnosti primjene metode u liječenju ljudi, potrebno je provesti dodatna istraživanja koja će ispitati mogućnost upotrebe više od jednog faktora rasta, upotrebu viralnih vektora nove generacije (npr. AAV), imunološki odgovor domaćina, kao i striktniju primjenu postoperacijskih protokola rehabilitacije.

7. SAŽETAK

Ozljede i oštećenja zglobne hrskavice vrlo su česte u ortopediji i sportskoj medicini, a svako takvo oštećenje predstavlja rizik za rani razvoj osteoartritisa, uz značajno smanjenje kvalitete života i povećanje troškova zdravstvene zaštite. Iako se trenutačno korištenim metodama liječenja oštećenja hrskavice postižu vrlo dobri klinički rezultati u smislu smanjenja bolova i poboljšanja opsega pokreta, niti jedna metoda nije do sada uspjela u potpunosti regenerirati normalnu hijalinu hrskavicu. Upravo zbog toga, istraživanja novih mogućnosti liječenja oštećenja zglobne hrskavice predstavljaju izazov podjednako i za kliničare i za one koji se bave bazičnom znanosti. Temeljna hipoteza ovog istraživanja jest da je uporabom adenoviralnog vektora koji nosi gen za kodiranje transformirajućeg faktor rasta- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) moguće uspješno transducirati stanice autologne koštane moždine, koje se potom u obliku ugruška implantiraju na mjesto hrskavičnog oštećenja, a novostvorena hrskavica je kvalitativno bolja od one stvorene bez uporabe genske terapije, odnosno od one stvorene samo umetanjem nepromijenjenog ugruška. Ciljevi ovog istraživanja bili su dokazati translacijsku vrijednost predložene metode, analizirati učinke transdukcije autologne koštane moždine faktorom rasta TGF- $\beta 1$ na obnovu hrskavičnog tkiva u oštećenju, i to procjenom histoloških, biokemijskih i biomehaničkih parametara. Pored toga cilj je bio utvrditi moguće „istjecanje“ virusnog vektora u stanice sinovijalne ovojnice. Nakon pribavljenog odobrenja Etičkih povjerenstava, u istraživanju su korištene ovce ($n=28$) u dobi od 1 do 3 godina. Na medijalnom kondilu femura učinjeno je djelomično hrskavično oštećenje upotrebom instrumenta za mozaikplastiku, u koje je potom transplantiran ugrušak autologne koštane moždine. Ugrušak je u odgovarajućim skupinama prethodno genski promijenjen upotrebom adenoviralnog vektora, odnosno transplantiran je nepromijenjen u kontrolnoj

skupini. Metodom slučajnog odabira životinje su podijeljene u 4 skupine: CON (kontrolna skupina, prazno oštećenje, n=6), BMC (pozitivna kontrola, transplantiran nepromijenjen ugrušak, n=6), GFP (pozitivna kontrola, transplantiran ugrušak prethodno transduciran da proizvodi GFP, n=6), te TGF (ispitivana skupina, transplatiran ugrušak prethodno transduciran da proizvodi TGF- β 1, n=10). Zdrava hrskavica iz kontralateralnog koljena svake životinje korištena je kao kontrola ispitivanim skupinama. Životinje su žrtvovane prema protokolu istraživanja nakon 6 mjeseci, a nakon žrtvovanja učinjena je histološka, biokemijska i biomehanička analiza novostvorenog tkiva. Rezultati provedenog istraživanja potvrdili su postavljenu hipotezu, te pokazali kako je primjenom predloženog *ex vivo* protokola za upotrebu genski promijenjenog ugruška autologne koštane moždine moguće dobiti hrskavični reparat zadovoljavajuće kvalitete, a uporaba faktora rasta TGF- β 1 dodatno poboljšava kvalitetu novostvorenog tkiva. To je razvidno iz analize histoloških preparata koji pokazuju da je u svim tretiranim skupinama došlo do stvaranja reparata, osim u kontrolnoj skupini s praznim oštećenjem. Rezultati biokemijske analize pokazuju optimalan udio glikozaminoglikana i kolagena tipa II jedino u skupini tretiranoj s TGF- β 1. Analiza biomehaničkih parametara IT AFM metodom otkriva kako je na mikrometarskom nivou reparat hrskavice iz TGF skupine najbližiji nativnoj hrksavice, dok je na nanometarskom nivou rezultat nešto lošiji obzirom na visoki ukupni udio kolagena i nizak udio vode. PCR analiza potvrdila je odsutstvo virusa iz svih analiziranih uzoraka sinovijalne ovojnice. Na osnovi rezultata provedenog istraživanja može se zaključiti kako je primjenom ugruška autologne koštane moždine moguće dobiti zadovoljavajuć reparat hrskavice u svim promatranim skupinama. Dodatna poboljšanja u kvaliteti reparata moguće je ostvariti adenoviralnim prijenosom gena za kodiranje TGF- β 1 koji se luči unutar samog ugruška, te *in situ* usmjerava i regulira hondrogenezu.

8. SUMMARY

Articular cartilage injuries are very common in orthopaedic surgery and sports medicine, and often, with time they lead to premature osteoarthritis, and consequently a decrease in quality of life and increase in costs of health care. Although mentioned procedures produce good clinical result in terms of pain relief and improvement of joint function, none of the currently used methods results in regeneration of healthy hyaline cartilage. Due to that fact, numerous preclinical and clinical studies are trying to overcome existing problems and suggest novel, improved methods to treat cartilage defects. Central hypothesis of the proposed study suggest that is possible to use adenoviral vector carrying gene for coding TGF- β 1 to transduce autologous bone marrow clot which is subsequently implanted into partial-thickness cartilage defects, and the newly formed tissue within the defect is qualitatively superior to the one formed without gene therapy. The aims of the proposed study are to: evaluate translational value of the proposed method, to analyze effects of the transduction with TGF- β 1 on restoration of cartilage by evaluation histological, biochemical and biomechanical parameters. Additional aim was to determine if there is a vector “leakage” from the clot into the surrounding synovial tissue. Upon obtaining local Ethical Committee approval, 28 skeletally mature sheep (1 to 3 years old) were used in this study. The sheep were randomly assigned to one of four groups. Partial-thickness chondral defect was made on the weight-bearing surface of the medial condyle with standard mosaicplasty instrument, and corresponding bone marrow clots were carefully inlaid into the defects without material fixation. In the bone marrow clot (BMC) group ($n=6$), the sheep were implanted with untreated autologous bone marrow clot that was aspirated from iliac crest of respected animal. In the bone marrow transduced with Ad.GFP (GFP) group ($n=6$), the sheep were implanted with autologous bone marrow clots

genetically modified to over express green fluorescent protein (GFP). In the bone marrow transduced with Ad.TGF- β 1 (TGF) group ($n=10$), the sheep were implanted with autologous bone marrow clots genetically modified to over express transforming growth factor- β 1. Six untreated sheep served as a control (defect without implant). Undamaged control articular cartilage also was taken from the medial condyle of the contralateral knee joint. All sheep were euthanatized 6 months after surgery, and histological, biochemical and biomechanical parameters of the newly formed tissue from the defect were analyzed. The results confirmed the central hypothesis, as they showed that it is possible to use abbreviated *ex vivo* protocol for genetical modification of autologous bone marrow clots to produce repair tissue within the defect, and the use of TGF- β 1 additionally improves the quality of newly formed cartilage. Histological analysis showed that new tissue formed in all the treatment groups except in the empty controls, and the biochemical analysis showed optimal content of glycosaminoglycans and collagen type II only in TGF treated group. IT AFM revealed that, on micrometer scale of tissue organization, newly formed cartilage from TGF treated group has biomechanical properties that are the closest to the native cartilage. On nanometer scale, the results are suboptimal due to high overall collagen content and low water content. PCR analysis of the synovial lining tissue could not detect residual presence of vector in none of the experimental groups. The results suggest that proposed method is a single-step procedure that can be easily implemented in standard clinical settings, and avoids the use of expensive *in vitro* production of autologous, engineered tissues. It was possible to produce cartilage tissue of satisfactory quality, and further improvements may be obtained with adenoviral transfer of TGF- β 1 that is secreted within the clot, and it stimulates and regulates the chondrogenesis process *in situ*.

9. LITERATURA

1. *Buckwalter JA*. Articular cartilage injuries. Clin Orthop 2002;37:21-37.
2. *Goldring MB*. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. Best Pract Res Clin Rheumatol 2006;20:1003-25.
3. *O'Driscoll SW*. The healing and regeneration of articular cartilage. J Bone J Surg (Am) 1998;80-A:1795-812.
4. *Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG*. Cartilage injuries: a review of 31 516 knee arthroscopies. Arthroscopy 1997;13:456-60.
5. *Aroen LS, Heir S, Alvik E, Ekeland A, Granlund OG, Engebretsen L*. Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. Am J Sports Med 2004;32:211-5.
6. *Johnson-Nurse C, Dandy DJ*. Fracture separation of articular cartilage in the adult knee. J Bone Surg (Br) 1985;67-B:42-3.
7. *Buckwalter JA, Mankin HJ*. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration and transplantation. Instr Course Lect 1998;47:487-504.
8. *Buckwalter JA, Mankin HJ*. Articular cartilage: Part I: tissue design and chondrocytes matrix interactions. J Bone Joint Surg (Am) 1997;79-A:600-11.
9. *Mankin HJ*. Current concepts review: the response of articular cartilage to mechanical injury. J Bone Joint Surg (Am) 1982;64-A:460-6.
10. *Chen ES, Frenkel SR, Di Cesare PE*. Repair of articular cartilage defects: Part I. Basic science of cartilage healing. Am J Orthop 1999;28:31-3.
11. *Nimer E, Schneiderman R, Maroudas A*. Diffusion and partition of solutes in cartilage under static load. Biophys Chem 2003;106:125-46.
12. *Hunziker E*. Articular cartilage structure in humans and experimental animals. U: Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JG, Hascall VC, ur. Articular Cartilage Structure and Osteoarthritis. New York: Raven Press, str. 183-99.
13. *Convery F, Akespn W, Keown G*. The repair of large osteochondral defects – an experimental study in horses. Clin Orthop Relat Res 1972;82:253-62.
14. *Johnsone B, Jung UY*. Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. Clin Orthop Rel Res 1999;367S:156-62.
15. *Ivković A*. Overuse Injuries in Young Athletes. U: Pećina M i Bojanić I, ur. Overuse Injuries of the Musculoskeletal System, 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2003, str. 375-93.

16. *Mankin HJ*. Reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis. *N Engl J Med* 1974;291:1285-335.
17. *Hunter W*. On the structure and diseases of articulating cartilage. *Phil Trans Roy Soc* 1743;42B:514-21.
18. *Jelić M, Smoljanović T*. Liječenje ozljeda hrskavice koljenskog zgloba. U: Krešimir Koržinek, ur. *Artroskopija koljena, ramena i gležnja*. Medicinska naklada, Zagreb, 2004, str. 17-29.
19. *Magnuson PB*. Joint debridement, surgical treatment of degenerative arthritis. *Surg Gynecol Obstet* 1941;73:1-9.
20. *Jackson DC*. The results of arthroscopic lavage and debridement of osteoarthritic knees based on severity of degeneration: a 4- to 6-year symptomatic follow-up. *Arthroscopy* 2003;19:13-20.
21. *Moseley JB, O'Malley K, Petersen NJ i sur.* A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med* 2002;347:81-8.
22. *Pridie KH*. A method of resurfacing osteoarthritis knee joints. *J Bone Joint Surg* 1959;41-B:618-9.
23. *Ficat RP, Ficat C, Gedeon PK, Toussaint JB*. Spongification: a new treatment for diseased patellae. *Clin Orthop Rel Res* 1979;144:74-83.
24. *Rodrigo JJ, Steadman JR, Silliman JF, Fulstone HA*. Improvement of full thickness chondral defect healing in the human knee after debridement and microfracture using continuous passive motion. *Am J Knee Surg* 1994;7:109-16.
25. *Steadman JR, Rodkey WG, Singleton SB, Briggs KK*. Microfracture technique for full thickness chondral defects: technique and clinical results. *Oper Tech Orthop* 1997;7:300-4.
26. *Steadman JR, Miller BS, Karas SG, Schlegel TF, Briggs KK, Hawkins RJ*. The microfracture technique in the treatment of full-thickness chondral lesion of the knee in National Football League players. *J Knee Surg* 2003;16:83-6.
27. *Hunziker EB*. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:432-63.
28. *Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG*. Outcomes of microfractures for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy* 2003;19:477-84.
29. *Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC i sur.* Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg (Am)* 2004;86-A:455-64.

30. *Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L i sur.* A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Finding at five years. *J Bone Joint Surg (Am)* 2007;89-A:2105-12.
31. *Magnussen RA, Dunn WR, Carey JL, Spindler KP.* Treatment of focal articular cartilage defects in the knee: a systematic review. *Clin Orthop Relat Res* 2008;466:952-62.
32. *Mithoefer K, Williams RJ 3rd, Warren RF i sur.* The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee. A prospective cohort study. *J Bone Joint Surg (Am)* 2005;87-A:1911-20.
33. *Kreuz PC, Erggelet C, Steinwachs MR i sur.* Is microfracture of chondral defects in the knee associated with different results in patients aged 40 years or younger? *Arthroscopy* 2006;22:1180-6.
34. *Peterson L, Menche D, Grande D, Pitman M.* Chondrocyte transplantation – an experimental model in rabbits. *Trans Orthop Res Soc* 1984;9:218.
35. *Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L.* Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New Engl J Med* 1994;331:889-95.
36. *Brittberg M, Peterson L, Sjogren-Jansson E, Tallheden T, Lindahl A.* Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. *J Bone Joint Surg (Am)* 2003;85-A,109-15.
37. *Saris DB, Vanlauwe J, Victor J i sur.* Characterised chondrocytes implantation results in better structural repair when treating symptomatic cartilage defects of the knee in randomised controlled trial versus microfracture. *Am J sport Med* 2008;36:233-44.
38. *Matsusue Y, Yamamuro T, Hama M.* Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy* 1993;9:318-21.
39. *Hangody L, Kish G, Karpati Z, Udvarhelyi, Szigeti I, Bely M.* Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopaedics* 1998;21:751-6.
40. *Hangody L, Rathonyi GK, Duska Z, Vasarhelyi G, Fules P, Modis L.* Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique. *J Bone Joint Surg (Am)* 2004;86-A Suppl 1:65-72.
41. *Evans PJ, Miniaci A, Hurtig MB.* Manual punch versus power harvesting of osteochondral grafts. *Arthroscopy* 2004;20:306-10.

42. *Ahn SE, Kim S, Park KH i sur.* Primary bone derived cells induce osteogenic differentiation without exogenous factors in human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:403–8.
43. *Barberi T, Willis LM, Socci ND i sur.* Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med* 2005;2:e161
44. *Karp JM, Ferreira LS, Khademhosseini A i sur.* Cultivation of human embryonic stem cells without the embryoid body step enhances osteogenesis in vitro. *Stem Cells* 2006;24:835–43.
45. *Caplan AI.* Review: mesenchymal stem cells: cell based reconstructive therapy in orthopaedics. *Tissue Eng* 2005;11:1198–211.
46. *Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D i sur.* Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med* 2005; 352:1959–966.
47. *Xu Y, Malladi P, Wagner DR i sur.* Adipose-derived mesenchymal cells as a potential cell source for skeletal regeneration. *Curr Opin Mol Ther* 2005;7:300–5.
48. *Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R i sur.* Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 2002;157:851–64.
49. *Zhang X, Mitsuru A, Igura K i sur.* Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:944–52.
50. *Ghen MJ, Roshan R, Roshan RO i sur.* Potential clinical applications using stem cells derived from human umbilical cord blood. *Reprod Biomed Online* 2006;13:562–72.
51. *De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM i sur.* Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 2007;25:100–6.
52. *Friedenstein AJ, Shapiro-Piatetzky II, Petrakova KV.* Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966;16:381-90.
53. *Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC i sur.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–7.
54. *Dominici M, Le BK, Mueller I i sur.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315–7.
55. *Horwitz EM, Le BK, Dominici M i sur.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7:393–5.

56. Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003;5:32-45.
57. Swieszkowski W, Tuan BH, Kurzydowski KJ, Hutmacher DW. Repair and regeneration of osteochondral defects in the articular joints. *Biomol Eng* 2007;24:489-95.
58. Yan H, Yu C. 2007. Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model. *Arthroscopy* 2007;23:178-87.
59. Chang F, Ishii T, Yanai T *i sur*. Repair of large full-thickness articular cartilage defects by transplantation of autologous uncultured bone-marrow-derived mononuclear cells. *J Orthop Res* 2008;26:18-26.
60. Mrugala D, Bony C, Neves N *i sur*. Phenotypic and functional characterisation of ovine mesenchymal stem cells: Application to a cartilage defect model. *Ann Rheum Dis* 2008;67:288-95.
61. Wakitani S, Nawata M, Tensho K, Okabe T, Machida H, Ohgushi H. Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: Three case reports involving nine defects in five knees. *J Tissue Eng Regener Med* 2007;1:74-9.
62. Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T *i sur*. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:226-31.
63. Urist M. Bone formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-9.
64. Pecina M, Haspl M, Jelic M, Vukicevic S. Repair of a resistant tibial non-union with a recombinant bone morphogenetic protein-7 (rh-BMP-7). *Int Orthop* 2003;27:320-1.
65. Trippel SB. Growth factors as therapeutic agents. *Instr Course Lect* 1997;46:473-6.
66. Lo YY, Cruz TF. Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J Biol Chem* 1995;270:11727-30.
67. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy M. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow; Differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* 2001;268:189-200.
68. Hanada K, Solchaga LA, Caplan AI *i sur*. BMP-2 induction and TGF-beta 1 modulation of rat periosteal cell chondrogenesis. *J Cell Biochem* 2001;81:284-94.
69. Jelic M, Pecina M, Haspl M, Kos J *i sur*. Regeneration of articular cartilage chondral defects by osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in sheep. *Growth Factors* 2001;19:101-13.

70. *Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A i sur.* Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor beta-1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:55-64.
71. *Fortier LA, Mohammed HO, Lust G, Nixon AJ.* Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *J Bone Joint Surg (Br)* 2002;84-B:276-88.
72. *Mierisch CM, Cohen SB, Jordan LC, Robertson PG, Balian G, Diduch DR.* Transforming growth factor-beta in calcium alginate beads for the treatment of articular cartilage defects in the rabbit. *Arthroscopy* 2002;18:892-900.
73. *van Beuningen HM, Glansbeek HL, van der Kraan PM, van den Berg WB.* Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-beta 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6:306-17.
74. *Ulrich-Vinther M, Stengaard C, Schwarz EM, Goldring MB, Soballe K.* Adeno-associated vector mediated gene transfer of transforming growth factor-beta1 to normal and osteoarthritic human chondrocytes stimulates cartilage anabolism. *Eur Cell Mater* 2005;10:40-50.
75. *Trippel SB.* Growth factor actions on articular cartilage. *J Rheumatol Suppl* 1995;43:129-32.
76. *Nixon AJ, Fortier LA, Williams J i sur.* Enhanced repair of extensive articular defects by insuline-like growth factor-I-laden fibrin composites. *J Orthop Res* 1999;17:475-87.
77. *Bi W, Deng JM, Zhang Z i sur.* Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 1999;22:85-9.
78. *Inada M, Yasui T, Nomura S i sur.* Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa-1-deficient mice. *Dev Dyn* 1999;214:279-90.
79. *Zhao GQ, Eberspaecher H, Seldin MF i sur.* The gene for homeodomain-containing protein Cart-1 is expressed in cells that have a chondrogenic potential during embrionic development. *Mech Dev* 1994;48:245-54.
80. *Sumarsono SH, Wilson TJ, Tymms MJ i sur.* Down's syndrome-like skeletal abnormalities in Ets2 trasngenic mice. *Nature* 1996;379:534-37.
81. *Hartmann C, Tabin CJ.* Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Development* 2000;127:3141-59.
82. *Lanske B, Karapalis AC, Lee K i sur.* PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 1996;273:553-666.
83. *Goldring MB, Fukuo K, Birkhead JR i sur.* Transcriptional supression by interleukin-1 and interferon-gamma of type II collagen gene expression in human chondrocytes. *J Cell Biochem* 1994;54:85-99.

84. *Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar TR i sur.* Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol* 1991;147:3915-20.
85. *Lieberman JR, Ghivizzani SC, Evans CH.* Gene transfer approaches to the healing of bone and cartilage. *Mol Ther* 2002;6:141-7.
86. *Evans CH, Ghivizzani SC, Smith P, Shuler FD, Mi Z, Robbins PD.* Using gene therapy to protect and restore cartilage. *Clin Orthop* 2000;379:214-9.
87. *Gersbach CA, Phillips JA, Garica AJ.* Genetic engineering for skeletal regenerative medicine. *Annu Rev Biomed Eng* 2007;9:87-119.
88. *Crystal RG.* transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 1995;270:404-10.
89. *Blaese RM.* Development of gene therapy for immunodeficiency: adenosine deaminase deficiency. *Paediatr Res* 1993;33:49-53.
90. *Robbins PD, Ghivizzani SC.* Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther* 1998;80:35-47.
91. *Herweijer H, Wolf JA.* Progress and prospects: Naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther* 2003;10:453-8.
92. *Nishikawa M, Huang L.* Nonviral vectors in the new millenium: Delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther* 2001;12:861-70.
93. *Somiari S, Glasspool-Malone J, Drabick JJ i sur.* Theory and in vivo application of electroporative gene therapy. *Mol Ther* 2000;2:178-87.
94. *Baru M, Nahum O, Jaaro H, Sha'anani J, Nur I.* Lysosome-disrupting peptide increases the efficiency of in vivo gene transfer by liposome-encapsulated DNA. *J Drug Target* 1998;6:191-9.
95. *Mason JM, Grande DA, Barica M i sur.* Expression of human bone morphogenetic protein 7 in primary rabbit periosteal cells: potential utility in gene therapy for osteochondral repair. *J Bone Joint Surg (Am)* 2003;85-A (Suppl):111-16.
96. *Gelse K, von der Mark K, Aigner T i sur.* Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells. *Arthritis Rheum* 2003;48:430-41.
97. *Carlberg AL, Pucci B, Rallapalli R i sur.* Efficient chondrogenic differentiation of mesenchymal cells in micromass culture bz retroviral gene transfer of BMP-2. *Differentiation* 2001;67:128-38.
98. *Nochi H, Sung JH, Lou J i sur.* Adenovirus mediated BMP-13 gene transfer induces chondrogenic differentiation of murine mesenchymal progenitor cells. *J Bone Miner Res* 2004;19:111-22.

99. *Baragi VM, Renkiewicz RR, Jordan H i sur.* Transplantation of transduced chondrocytes protects articular cartilage from interleukin 1-induced extracellular matrix degradation. *J Clin Invest* 1995;96:2454-60.
100. *Madry H, Cucchiaroni M, Terwilliger EF, i sur.* Efficient and persistent gene transfer into articular cartilage using recombinant adeno-associated vectors in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 2003;14:393-402.
101. *Arai Y, Kubo T, Fushiki S i sur.* Gene delivery to human chondrocytes by an adeno-associated virus vector. *J Rheumatol* 2000;27:979-82.
102. *Browland-Toland BD, Saxer RA, Goodrich LR i sur.* Direct adenovirus-mediated insulin-like growth factor I gene transfer enhances transplant chondrocyte function. *Hum Gene Ther* 2001;12:117-29.
103. *Shuler FD, Georgiescu HI, Niyibizi C i sur.* Increased matrix synthesis following adenoviral transfer of transforming growth factor beta 1 gene into articular chondrocytes. *J Orthop Res* 2000;18:585-92.
104. *Hunziker EB, Rosenberg LC.* Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone J Surg (Am)* 1996;78-A:432-63.
105. *Muller-Ladner U, Evans CH, Franklin BN i sur.* Gene transfer of cytokine inhibitors into human synovial fibroblasts in the SCID mouse model. *Arthritis Rheum* 1999;42:490-7.
106. *Robbins PD, Evans CH, Chernajovsky Y.* Gene therapy for arthritis. *Gene Ther* 2003;10:902-11.
107. *Bandara G, Mueller GM, Galea-Lauri J.* Intraarticular expression of biologically active interleukin 1-receptor- antagonist protein by ex vivo gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:10764-8.
108. *Nixon AJ, Brower-Toland BD, Bent SJ i sur.* Insulinlike growth factor-I gene therapy applications for cartilage repair. *Clin Orthop* 2000;43:S201-13.
109. *Anderson WF.* Human gene therapy. *Nature* 1998;392 (6679 Suppl):25-30.
110. *Gossen M, Bujard H.* Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2567-71.
111. *Worthington J, Robson T, Murray M, O'Rourke M, Kelly G, Hirst DG.* Modification of vascular tone using iNOS under the control of a radiation-inducible promoter. *Gene Ther* 2000;7:1126-31.
112. *Nita I, Ghivizzani SC, Galea-Lauri J i sur.* Direct gene delivery to synovium. An evaluation of potential vectors in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum* 1996;39:820-28.

113. *Gouze E, Pawliuk R, Pilapil C i sur.* In vivo gene delivery to synovium by lentiviral vectors. *Mol Ther* 2002;5:397-404.
114. *Zhang HG, Xie J, Yang P i sur.* Adeno-associated virus production of soluble tumor necrosis factor receptor neutralizes tumor necrosis factor alpha and reduces arthritis. *Hum Gene Ther* 2000;11:2431-42.
115. *Pan RY, Chen SL, Xiao X i sur.* Therapy and prevention of arthritis by recombinant adeno-associated virus vector with delivery of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 2000;43:289-297.
116. *Mi Z, Ghivizzani SC, Lehman ER i sur.* Adverse effects of adenovirus-mediate gene transfer of human transforming growth factor beta 1 into rabbit knees. *Arthritis Res Ther* 2003;5:R132-139.
117. *Mi Z, Ghivizzani, Lehman ER i sur.* Adenovirus-mediated gene transfer of insulin-like growth factor 1 stimulates proteoglycan synthesis in rabbit joints. *Arthritis Rheum* 2000;43:2563-70.
118. *Tomita T, Hashimoto H, Tomita N i sur.* In vivo direct gene transfer into articular cartilage by intraarticular injection mediated by HVJ (Sendai virus) and liposomes. *Arthritis Rheum* 1997;40:901-6.
119. *Kang R, Marul T, Ghivizzani SC i sur.* Ex vivo gene transfer to chondrocytes in full-thickness articular defects: a feasibility study. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;5:139-43.
120. *Baragi VM, Renkiewicz RR, Qiu L i sur.* Transplantation of adenovirally transduced allogenic chondrocytes into articular cartilage defects in vivo. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;5:275-82.
121. *Hung CT, Lima EG, Mauck RL i sur.* Anatomically shaped osteochondral constructs for articular cartilage repair. *J Biomech* 2003;36:1853-6.
122. *Lee DA, Reisler T, Bader DL.* Expansion of chondrocytes for tissue engineering in alginate beads enhances chondrocyte phenotype compared to conventional monolayer techniques. *Acta Orthop Scand* 2003;74:6-15.
123. *Senel S, McClure SJ.* Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:1467-80.
124. *Grigolo B, Roseti L, Fiorini M i sur.* Transplantation of chondrocytes seeded on hyaluronan derivative (hyaff-11) into cartilage defects in rabbits. *Biomaterials* 2001;22:2417-24.
125. *Sims CD, Butler PE, Cao YL i sur.* Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes. *Plast Reconstr Surg* 1998;101:1580-5.
126. *Rahman MS, Tsuchiya T.* Enhancement of chondrogenic differentiation of human articular chondrocytes by biodegradable polymers. *Tissue Eng* 2001;7:781-90.

127. *Wakitani S, Kimura T, Hirooka A i sur.* Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg (Br)* 1989;71:74-80.
128. *Allemann F, Mizuno S, Eid K, Yates K, Zaleske D, Glowacki J.* Effects of hyaluronan on engineered articular cartilage ECM gene expression in 3-dimensional collagen scaffolds. *J Biomed Mater Res* 2001;55:13-9.
129. *Masuda K, Sah R, Hejna M, Thonar E.* A novel two-step method for the formation of tissue-engineered cartilage by mature bovine chondrocytes: The alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method. *J Orthop Res* 2003;21:139-48.
130. *Guillen P, Abelow SP, Fernandez Jaen T.* Sažetak: Matrix/membranous autologous chondrocyte implantation for the treatment of large chondral defects in the knee and ankle, U: Final Program. Rosemont, IL: American Orthopaedic Society for Sports Medicine, 2005, str. 145.
131. *Bartlett W, Skinner JA, Gooding CR i sur.* Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: A prospective, randomised study. *J Bone Joint Surg (Br)* 2005;87-B:640-5.
132. *Grigolo B, Lisignoli G, Piacentini A i sur.* Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAff 11): Molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials* 2002;23:1187-95.
133. *Marcacci M, Berruto M, Brocchetta D i sur.* Articular cartilage engineering with Hyalograft C: 3-year clinical results. *Clin Orthop Relat Res* 2005;435:96-105.
134. *Strauss EJ, Goodrich LR, Chen CT, Hidaka C, Nixon AJ.* Biochemical and biomechanical properties of lesion and adjacent articular cartilage after chondral defect repair in an equine model. *Am J Sports Med* 2005;33:1647-53.
135. *Zehbe R, Libera J, Gross U, Schubert H.* Short-term human chondrocyte culturing on oriented collagen coated gelatine scaffolds for cartilage replacement. *Biomed Mater Eng* 2005;15:445-54.
136. *Hardy S, Kitamura M, Harris-Stansil T, Dai Y, Phipps ML.* Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J Virol* 1997;71:1842-9.
137. *Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M i sur.* Histological assessment of cartilage repair. *J Bone J Surg (Am)* 2003;85-A:45-57.
138. *Dickinson SC, Sims TJ, Pittarello L, Soranzo C, Pavesio A, Hollander AP.* Quantitative outcome measures of cartilage repair in patients treated by tissue engineering. *Tissue Eng* 2005;11:277-87.

139. *Farndale R, Buttle D, Barrett A.* Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta* 1986;883:173-7.
140. *Stolz M, Raiteri R, Daniels AU, Van Ladingham MR, Baschong W, Aebi U.* Dynamic elastic modulus of porcine cartilage determined at two different levels of organization by indentation-type atomic force microscopy. *Biophys J* 2004;68:3269-83.
141. *Rosenberg L.* Chemical basis for the histological use of safranin O in the study of articular cartilage. *J Bone Joint Surg (Am)* 1971;53-A:69-82.
142. *Martin I, Obradovic B, Freed LE, Vunjak-Novakovic G.* Method for quantitative analysis of glycosaminoglycan distribution in cultured natural and engineered cartilage. *Ann Biomed Eng* 1999;27:656-62.
143. *Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M.* Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 2002;18:730-4.
144. *Sato T, Chen G, Ushida T, Ishii T, Ochiai N, Tateishi T.* Evaluation of PLLA-collagen hybrid sponge as a scaffold for cartilage tissue engineering. *Mater Sci Eng* 2004;24:365-72.
145. *Oshima Y, Watanabe N, Matsuda K, Takai S, Kawata M, Kubo T.* Behaviour of transplanted bone marrow-derived GFP mesenchymal cells in osteochondral defect as a simulation of autologous transplantation. *J Histochem Cytochem* 2005;53:207-16.
146. *An YH, Freidman RJ.* Animal Models in Orthopaedic Research. CRC Press LLC; 1999.
147. *Shao XX, Hutmacher DW, Ho ST, Goh J, Lee EH.* Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load-bearing osteochondral defects in rabbits. *Biomaterials* 2006;27:1071-80.
148. *Cook SD, Patron LP, Salkeld SL, Rueger DC.* Repair of articular cartilage defects with osteogenic protein-1 (BMP-7) in dogs. *J Bone Joint Surg (Am)* 2003;85-A:116-23.
149. *Ahern BJ, Parvizi J, Boston R, Schaer TP.* Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; doi:10.1016/j.joca.2008.11.008.
150. *Bryant SJ, Anseth KS.* The effects of scaffold thickness on tissue engineered cartilage in photo cross linked poly(ethylene oxide) hydrogels. *Biomaterials* 2001;22:619-26.
151. *Hunter CJ, Imler SM, Malaviya P, Nerem RM, Levenston ME.* Mechanical compression alters gene expression and extracellular matrix synthesis by chondrocytes cultured in collagen I gels. *Biomaterials*. 2002;23:1249-59.

152. *Ragan PM, Badger AM, Cook M i sur.* Down-regulation of chondrocyte aggrecan and type-II collagen gene expression correlates with increases in static compression magnitude and duration. *J Orthop Res* 1999;17:836-42.
153. *Ikenoue T, Trindade MC, Lee MS i sur.* Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro. *J Orthop Res* 2003;21:110-6.
154. *Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ.* Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res* 2001;391 Suppl:S362-9.
155. *Tuli R, Tuli S, Nandi S i sur.* Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J Biol Chem* 2003;278:412-27.
156. *Palmer GD, Steinert A, Pascher A i sur.* Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Ther* 2005;2:219-28.
157. *Lee KH, Song SU, Hwang TS i sur.* Regeneration of hyaline cartilage by cell-mediated gene therapy using transforming growth factor beta 1-producing fibroblasts. *Hum Gene Ther* 2001;12:1805-13.
158. *Guo CA, Liu XG, Huo JZ, Jiang C, Wen XJ, Chen ZR.* Novel gene-modified-tissue engineering of cartilage using stable transforming growth factor-beta1-transfected mesenchymal stem cells grown on chitosan scaffolds. *J Biosci Bioeng* 2007;103:547-56.
159. *Steinert AF, Palmer GD, Pilapil C, Ulrich N, Evans CH, Ghivizzani SC.* Enhanced in vitro chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells by combined gene transfer. *Tissue Eng* 2008;14:1-13.
160. *Van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, van den Berg WB.* Transforming growth factor- β 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab Invest* 1994;71:279-90.
161. *Pascher A, Palmer GD, Steinert A i sur.* Gene delivery to cartilage defects using coagulated bone marrow aspirate. *Gene Therapy* 2004;11:133-41.
162. *McPhee SW, Janson CG, Li C i sur.* Immune response to AAV in phase I study for Canavan disease. *J Gene Med* 2006;8:577-88.
163. *Pagnotto MR, Wang Z, Karpie JC, Feretti M, Xiao X, Chu CR.* Adeno-associated viral gene transfer of transforming growth factor- β 1 to human mesenchymal stem cells improves cartilage repair. *Gene Ther* 2007;14:804-13.

164. *Cohen NP, Foster RJ, Mow VC.* Composition and dynamics of articular cartilage: structure, function, and maintaining healthy state. *J Orthop sports Phys Ther* 1998;28:203-15.
165. *Appleyard RC, Swain MV, Khanna GA, Murrell GA.* The accuracy and reliability of novel handheld dynamic indentation probe for analysing articular cartilage. *Phys Med Biol* 2001;46:541-50.
166. *Lyyra T, Jurvelin J, Pitkanen U, Vaatainen U, Kiviranta I.* Indentation instrument for the measurement of cartilage stiffness under arthroscopic control. *Med Eng Phys* 1995;17:395-9.
167. *Stolz M, Raiteri R, Daniels AU, VanLandingham MR, Baschong W, Aebi U.* Dynamic elastic modulus of porcine articular cartilage determined at two different levels of tissue organization by indentation-type atomic force microscopy. *Biophys J* 2004;86:3269-83.
168. *Stolz M, Aebi U, Stoffer D.* Developing scanning probe-based nanodevices - stepping out of the laboratory into the clinic. *Nanomedicine* 2007;3:53-62.
169. *Swanepoel MW, Smeathers JE, Adams LM.* The stiffness of human apophyseal articular cartilage as an indicator of joint loading. *Proc Inst Mech Eng H (J Eng Med)* 1994;208:33-43.
170. *Appleyard RC, Swain MV, Khanna GA, Murrell GA.* The accuracy and reliability of novel handheld dynamic indentation probe for analysing articular cartilage. *Phys Med Biol* 2001;46:541-50.
171. *Evans CH, Palmer GD, Pascher A, i sur.* Facilitated endogenous repair: making tissue engineering simple, practical and economical. *Tissue Eng* 2007;8:1987-93.
172. *Marlovits S, Mamisch TC, Vekszler G, Resinger C, Trattnig S.* Magnetic resonance imaging for diagnosis and assessment of cartilage defect repairs. *Injury* 2008;39:S13-25.

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 10. kolovoza 1974. godine u Zagrebu. Osnovnu i srednju školu (po programu International Baccalaureate) završio sam u Zagrebu, kao i Medicinski fakultet (1993.-1999.). Tijekom studija dobio sam stipendiju grada Zagreba koja se dodjeljuje najboljim studentima grada. Pripravnički staž odradio sam u KB Merkur, a državni sam ispit položio u ožujku 2001. godine. Od lipnja 2001. do lipnja 2002. radio sam kao medicinski savjetnik u odjelu elektroničkog poslovanja farmaceutske kompanije Pliva d.d. Za rad na dizajnu zdravstvenih i medicinskih Internet portala nagrađen sam 2002. Plivinom godišnjom nagradom. Od 2002. do 2006. na Klinici za ortopediju KBC Zagreb provodim specijalizaciju iz ortopedije, a u veljači 2007. godine položio sam specijalistički ispit. Tijekom specijalizacije završio sam stručni poslijediplomski studij iz ortopedije. Od ožujka 2007. radim u Kliničkom zavodu za rehabilitaciju i ortopedska pomagala KBC Zagreb.

Školske godine 2004/2005 upisao sam doktorski poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Objavio sam sedam radova koji su indeksirani u CC-u (Current Contents), a osam radova koji su indeksirani u ostalim bazama podataka (SCI Expanded, Medline, EMBASE). Autor sam više od deset poglavlja u raznim knjigama, udžbenicima i enciklopedijama, a kao predavač sam aktivno sudjelovao na više od trideset domaćih i međunarodnih kongresa i skupova.

Tijekom 2004. godine boravio sam kao stipendist Europskog udruženja ortopeda i traumatologa (EFORT) u Nizozemskoj 10 dana. Akademsku godinu 2007./2008. proveo sam kao Fulbrightov stipendist u Centru za molekularnu ortopediju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Harvard u Bostonu, SAD. Kao član skupine prof. Chrisa Evansa radio sam na translacijskim projektima primjene molekularnih metoda u regeneraciji i reparaciji koštanog i hrskavičnog tkiva. Kao rezultat mog istraživanja na području osteogenih svojstava

mezenhimalnih stromalnih stanica podnesen je zahtjev za patentnom zaštitom nove metode za pospješivanje koštanog cijeljenja. U prosincu 2008. godine dodijeljena mi je prestižna stipendija Međunarodnog društva za istraživanje hrskavice (International Cartilage Research Society) - ICRS Stryker Travelling Fellowship. Stipendija se dodjeljuje mladim kliničarima-znanstvenicima kao priznanje za dosadašnje rezultate i poticaj za daljnja istraživanja na području liječenja bolesti i ozljeda hrskavice.

Član sam Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog udruženja ortopeda i traumatologa, Ortopedskog istraživačkog društva (Orthopaedic Research Society), Američke akademije ortopedskih kirurga (American Academy of Orthopaedic Surgeons), Međunarodnog društva za istraživanje hrskavice (International Cartilage Research Society), te AO Alumni ogranka za Hrvatsku.

Potpredsjednik sam Zdravstvene komisije Hrvatskog vaterpolskog saveza, te službeni liječnik seniorske vaterpolske reprezentacije. Koordinator sam skupine za osnivanje Hrvatskog instituta za sportsku medicine pri Hrvatskom olimpijskom odboru.

Aktivno se služim engleskim i talijanskim jezikom, a pasivno i španjolskim.

Oženjen sam i otac jednog djeteta.